



Efecto de diferentes niveles de fitasa microbiana en dos diferentes dietas una a base de trigo y la otra a base de centeno en presencia o no de fitasa endógena

Tesis de Master

**IAMZ
2012-2013**

Realizado por: Mustapha BOUDA

Dirigida por: Dra. Anna María PEREZ VENDRELL

Zaragoza, 2013

Agradecimiento

Llegado este momento quiero agradecer a todas aquellas personas que me han ayudado y apoyado directa e indirectamente para la realización de esta tesis.

Agradezco en primer lugar a Dios, después a mis directores de tesis; Joaquim Brufau y Anna María Perez Vendrell, por la oportunidad que me han dado para realizar este trabajo, sus consejos, enseñanzas, paciencia y confianza, todo ello para que esta tesis llegue a buen puerto. También deseo agradecer a los investigadores y personal de departamento de la nutrición animal de “Mas de Bover” y del laboratorio por su disponibilidad y ayuda para solucionar cualquier tipo de duda y/o problema. Al personal de las granjas del IRTA especialmente Alfonso Mejias y la aportación de su experiencia en cuanto al manejo, a Lluís Llauredó por su disponibilidad de acompañarnos para hacer visitas a unas empresas dedicadas en el sector de la nutrición animal (CESAC, matadero...etc)

No quiero acabar sin nombrar a los compañeros de laboratorio, departamento, amigos y todas aquellas personas que me han echado una mano cuando lo he necesitado y que han contribuido a esta etapa maravillosa de mi vida.

Por último, deseo de corazón dar las gracias a mi familia y a mis amigos por su apoyo incondicional.

Índice

Resumen	IX
Abstract	XI
Résumé	XIII
I- Revisión bibliográfica.....	1
I.1. Introducción:	1
I.2. El fosforo:	2
I.2.1-Estrategias para reducir la emisión de fosforo en pollos de engorde:.....	3
I.2.1.1-Alimentación multifase:	4
I.2.1.2-Selección de las materias primas:	4
I.2.1.3- Valorización del fosforo fitico por la adición de aditivos:	4
I.3. Requerimientos del fosforo:.....	5
I.4. El calcio:	6
I.5. EL fitato:	7
I.5. Aspectos negativos del fitato :	8
I.5.1-Iones minerales:	8
I.5.2. Efecto en la disponibilidad de proteína y aminoácidos:	9
I.5.3. Efecto en la digestibilidad de la energia :	10
I.6. La fitasa:	11
I.6.1. Fitasa de las plantas:	12
I.6.2. Fitasa microbiana:	12
I.6.3. Fitasa de la microflora intestinal:	13
I.6.4. Fitasa derivada de la mucosa del intestino delgado:	13
I.7. Función catalítica:	13
I.8. Características de la fitasa:.....	15
I.8.1. pH y temperatura optima:	15
I.8.2. Termoestabilidad:	15
I.8.3. Resistencia a la proteólisis:	15
I.9. Beneficios nutricionales de la fitasa:	16
I.9.1. Parámetros productivos:.....	16
I.9.2. Disponibilidad de proteínas y aminoácidos:	17
I.9.3.Factores influyen el efecto de la fitasa en la utilización de proteína y aminoácidos: ...	18
I.9.3.1. Elección de marcador inerte:	18
I.9.3.2. Factores de alimentación:.....	18
I.9.3.3. Las cuestiones relativas a los protocolos experimentales:	19

1.9.3.4. Factores de animales:	19
1.9.4. Utilización de la energía:	19
1.9.4.1. Fitasa y energía derivada de la grasa, proteína y almidón:	20
1.9.5. Disponibilidad del fosforo y el calcio:	20
1.9.6. Disponibilidad de otros minerales:	21
III-Material y métodos:	24
III.1. Métodos analíticos:	24
III.2. Animales experimentales:	25
III.3. Dietas basales:	25
III.4. Tratamientos experimentales:	27
III.5. Preparación de muestras:	27
III.6. Parámetros productivos:	28
III.7. Actividad fitasa:	28
III.8. Viscosidad intestinal:	28
III.9. Composición mineral del plasma:	28
III.10. Cenizas de los dedos y las tibias:	28
III.11. Balance proteico, energético y mineral:	29
III.11.1. Energía metabolizable retención fecal aparente de minerales:	29
III.11.2. Digestibilidad ileal de proteína:	30
III.12. Análisis estadística:	30
IV-Resultados:	31
IV.1. Parámetros productivos y viscosidad intestinal:	33
a- Experimento 1:	33
b- Experimento 2:	35
IV.2. Valores energéticos y digestibilidad ileal aparente de la proteína:	38
a- Experimento 1:	38
b- Experimento 2:	40
IV.3. Composición mineral del plasma y la composición de los dedos:	42
a- Experimento 1:	42
b- Experimento 2:	43
IV.4. Excreción de los minerales y retención aparente del fosforo total y del calcio en las dietas experimentales:	49
a- Experimento 1:	49
b- Experimento 2:	53
IV.5. Ingesta de los minerales:	57
a- Experimento 1:	57

b- Experimento 2:.....	59
V. Discusión:	61
VI. Conclusiones:	67
VII- Bibliografía:.....	68

Índice de tablas

Tabla 1: Media ponderada (y rango) de las concentraciones de P total y de PP, y proporción de PP al P total, en ingredientes base de piensos para aves.	9
Tabla 2 : Las interacciones negativas del fitato y los nutrientes en los alimentos	10
Tabla 3: Características generales de la fitasa de diversas fuentes.....	14
Tabla 4: Composición de las dietas basales.	26
Tabla 5: Tratamientos experimentales.....	27
Tabla 6: la actividad fitasa encontrada en las dietas experimentales.....	31
Tabla 7: análisis proximales de les dietas experimentales.	32
Tabla 8: parámetros productivos y viscosidad intestinal de 1 a 21 días en dietas a base de centeno (análisis jerárquico).....	33
Tabla 9: Parámetros productivos y viscosidad intestinal de 1 a 21 días en dietas a base de centeno (análisis factorial)	34
Tabla 10: parámetros productivos y viscosidad intestinal de 1 a 21 días en dietas a base de trigo (análisis jerárquico).	36
Tabla 11: Parámetros productivos y viscosidad intestinal de 1 a 21 días en dietas a base de trigo (análisis factorial).	37
Tabla 12: Valores energéticos de las dietas experimentales a base de centeno, y digestibilidad ileal aparente de la proteína (análisis jerárquico).	39
Tabla 13: valores energéticos de las dietas experimentales a base de centeno, y digestibilidad ileal aparente de la proteína (análisis factorial).	39
Tabla 14: Valores energéticos de las dietas experimentales a base de trigo, y digestibilidad ileal aparente de la proteína (análisis jerárquico).	40
Tabla 15: Valores energéticos de las dietas experimentales a base de trigo, y digestibilidad ileal aparente de la proteína (análisis factorial).	41
Tabla 16: Composición mineral de la plasma, y composición de los dedos y tibias del ensayo 1 (análisis jerárquico).	45
Tabla 17: Composición mineral de la plasma, y composición de los dedos y tibias del ensayo 1 (análisis factorial).	46
Tabla 18: Composición mineral de la plasma, y composición de los dedos del ensayo 2 (análisis jerárquico).	47
Tabla 19: Composición mineral de la plasma, y composición de los dedos y tibias del ensayo 2 (análisis factorial).	48
Tabla 20: excreción de los minerales y retención aparente del fosforo total y del calcio en las dietas experimentales a base de centeno (análisis jerárquico).	51

Tabla 21: excreción de los minerales y retención aparente del fosforo total y del calcio en las dietas experimentales a base de centeno (análisis factorial).	52
Tabla 22: excreción de los minerales y retención aparente del fosforo total y del calcio en las dietas experimentales a base de trigo (análisis jerárquico).	54
Tabla 23: excreción de los minerales y retención aparente del fosforo total y del calcio en las dietas experimentales a base de trigo (análisis factorial).	55
Tabla 24: ingesta de los minerales de las dietas experimentales a base de centeno (análisis jerárquico).	58
Tabla 25: ingesta de los minerales de las dietas experimentales a base de centeno (análisis factorial).	599
Tabla 26: ingesta de los minerales de las dietas experimentales a base de trigo (análisis jerárquico).	60
Tabla 27: ingesta de los minerales de las dietas experimentales a base de trigo (análisis factorial)	61

Índice de figuras

Figura 1: Estructura del ácido fitico	8
Figura 2: actividad catalítica de la fitasa sobre el ácido fitico	14

Nomenclatura

%: Porcentaje

A. *Ficum*: *Aspergillus Ficum*

A. *Fumigatus*: *Aspergillus Fumigatus*

A. *Penicillium*: *Aspergillus Penicillium*

A. *Niger*: *Aspergillus Niger*

AOAC: Association of Official

Analytical Chemistry

ATP: AdenosinTrifosfato

BED: Balance Electrolítico Dietético

°C: Grados centígrados

Ca: Calcio

CaCO₃: Oxido de Titanio

CMD: Consumo Medio Diario

CN: Control Negativo

CP: Control Positivo

cps: centipoise

Cu: Cobre

d: días

DE: Desviación Estándar

dl: decilitro

EMA: Energía Metabolizable Aparente

EMAn: Energía Metabolizable Aparente

Corregida por Nitrógeno

Err.Es: Error Estándar

Fe: Hierro

FTU: Unidad fitasa

g: gramos

GMD: Ganancia Media Diaria

ug: Microgramo

Zn: Zinc

HAPC: Maíz con alto contenido de
fósforo disponible

IC: Índice de Conversión

IU: unidad internacional

Kcal: Kilocaloría

Kg: Kilogramo

L: Litro

m²: metro cuadrado

mg: miligramo

ml: mililitro

MS: Materia Seca

N: Nitrógeno

Na: Sodio

NH₃: Amoniac

NRC: National Research Council

P: Fósforo

PB: Proteína Bruta

pH: Potencial de iones hidrógeno

Pi: Fósforo inorgánico

PNP: Fósforo no fitico

PP: Fósforo Fitico

ppm: Partes por millón

P-valor: Probabilidad

rpm: Revoluciones por minuto

T: Tratamiento

TiO₂: Oxido de titanio

U: Unidad fitasa

UE: Unión Europea

Resumen

El objetivo del estudio fue evaluar el uso de dos niveles de fitasa microbiana en dos tipos de dieta que variaban en el cereal empleado sobre los parámetros productivos y valores energéticos, retención, excreción e ingesta de los minerales. Se realizaron dos experimentos, ambos con el mismo diseño experimental pero distintos en el cereal de base de las dietas. En el primer ensayo se utilizó centeno y en el segundo se empleó trigo. Se utilizaron en cada ensayo, doscientos ochenta y ocho pollos machos de la estirpe Ross 308. Los pollitos se asignaron a 48 jaulas ubicadas en dos baterías Petersime, con nido con calentamiento eléctrico, y cada réplica consistió en 6 animales. En ambos ensayos se evaluaron ocho tratamientos experimentales replicados seis veces y asignados por bloques al azar. Se utilizaron cuatro tipos de dietas diferentes, según el tipo de cereal utilizado (tratado o no tratado por autoclave) y dos niveles de fósforo inorgánico (0.45% o 0.27%) y con la adición o no de dos niveles de fitasa microbiana (0, 500 y 5000 U/kg) a las dietas bajas en fósforo. Se incluyó 0,5% de óxido de titanio (TiO_2) en las dietas de los dos ensayos como marcador de digestibilidad. Se analizaron los efectos de los distintos tratamientos, incluyendo las dietas con nivel alto de P mediante un conjunto de contrastes lineales, y se evaluó asimismo el efecto de la fitasa sobre la dieta con bajo nivel de fósforo y el tratamiento con autoclave, con un ensayo factorial 2 x 3.

En el experimento 1, el tratamiento por autoclave el cereal mejoró la respuesta productiva de las aves, pero empeorando el índice de conversión y se observó una disminución de la viscosidad intestinal, y. La reducción de la concentración del P en las dietas empeoró el índice de conversión en las dietas sin tratamiento de autoclave. No se observaron interacciones significativas entre el nivel de fitasa y el tratamiento con autoclave. La adición de fitasa aumentó la ganancia de peso y el consumo de pienso de forma dosis dependiente. El tratamiento del centeno por autoclave mejoró los valores de la energía metabolizable, sin afectar la digestibilidad de la proteína, mientras que la adición de la fitasa microbiana no tuvo efecto tanto en los valores de la energía como la digestibilidad de la proteína. La reducción de nivel de P en las dietas redujo la concentración plasmática del Ca y el P y no afectó los valores del Fe y Zn, mientras que redujo la concentración de cenizas de los dedos. Por otra parte, el tratamiento por autoclave mejoró la concentración plasmática de Ca, pero redujo la del P y también redujo los valores de cenizas de los dedos. Sin embargo, la fitasa microbiana aumentó los valores de las cenizas y la concentración plasmática de P. Asimismo se observaron interacciones significativas entre los factores evaluados, en cuanto la concentración plasmática de P, Fe y el porcentaje de las cenizas. La disminución del nivel de P en las dietas redujo la excreción del fósforo y el calcio y aumento la retención de estos dos

minerales. La autoclave no tuvo efecto sobre la excreción de los dos minerales, mientras que aumentó la retención de Ca. Sin embargo, la adición de la fitasa microbiana mejoró la retención de Ca y redujo su excreción. Al disminuir el nivel de P en las dietas se redujo la ingesta del Ca y P. El tratamiento del centeno con autoclave aumentó la ingesta de los minerales, mientras la adición de la fitasa aumento la ingesta de P sin afectar la del Ca. Se observó interacción significativa entre la fitasa y el tratamiento por autoclave del centeno en cuanto la ingesta de Fe.

En el experimento 2, la reducción del P y el tratamiento por autoclave del trigo empeoraron los parámetros productivos. La autoclave aumentó la viscosidad intestinal. La adición de la fitasa microbiana produjo mejoras en los parámetros productivos sin afectar la viscosidad intestinal. Referente a la energía, el tratamiento del trigo por autoclave mejoró los valores de EMAn sin afectar la digestibilidad de la proteína, mientras que la fitasa microbiana mejoró los valores de EMA y EMAn y también aumentó la digestibilidad de la proteína. Tratar el trigo por autoclave, tuvo un efecto positivo sobre la concentración plasmática de P sin afectar la del Ca, y se obtuvo el efecto contrario cuando se redujo el nivel de P en las dietas, bajando la concentración plasmática del P. La adición de fitasa exógena aumentó el fósforo plasmático sobre todo con dosis altas. Referente a las cenizas, sus concentraciones se redujeron cuando se disminuyó el nivel de P en las dietas y se aumentó con la adición de la fitasa microbiana, mientras que la autoclave no tuvo efecto sobre sus valores. Las dietas deficientes en PNP, tendieron a bajar la excreción del P y Ca y aumentaron sus retenciones. La retención de P aumentó con la adición de la fitasa microbiana, mientras que su excreción no se afectó ni por el tratamiento por autoclave ni por la adición de fitasa. Los dos factores (fitasa, autoclave) tuvieron efectos negativos sobre la retención del Ca. Además, se observó una interacción significativa entre la fitasa y el tratamiento de trigo por autoclave en cuanto a la excreción de Fe. La disminución del nivel de PNP en las dietas, conllevó una reducción de la ingesta de P y Ca. Esta reducción de la ingesta de P se vio mejorada por el tratamiento por autoclave y la fitasa microbiana, mientras que se obtuvo el efecto contrario con la ingesta de Ca. Se observaron interacciones entre la fitasa y el tratamiento de trigo por autoclave en cuanto la ingesta de Zn y Fe. En general, no se observaron efectos debido a la presencia o no de fitasa endógena de centeno y trigo.

Palabras clave: fitasa microbiana; Fosforo; Pollos; Centeno; Trigo; Fitasa endógena.

Abstract

The aim of the work was to study the use of two levels of microbial phytase in two different diets varying in cereal employed on performance and energy values, retention, excretion and intake of minerals. Two experiments were conducted, both with the same experimental design but different in cereal-based diets. In the first trial rye was used and in the second wheat was used. In each trial, three hundred eighty-eight male chicks of Ross 38 strain were used. The chicks were housed in 48 cages in two Petersime battery brooders with electrical heating, each replicate consisting of 6 animals. In both trials, eight experimental dietary treatments replicated six times and randomly assigned by blocks were evaluated. Four different types of diets were tested, according to the type of the cereal used (untreated or autoclaved) and two levels of inorganic phosphorus (0.45% o 0.27%) and addition or not of two doses of microbial phytase (0, 500 y 5000U/kg) to the P-deficient diets. Diets included 0.5% titanium oxide (TiO₂) as a digestibility tracer. Examined The effects of different treatments, including diets with high levels of P, were examined using a set of linear contrasts and the effects of phytase on the diets with a low level of phosphorus and autoclave treatment were also assessed with a statistical 2 x 3 factorial analysis.

In experiment 1, autoclaving resulted in a reduction of the intestinal viscosity and improved the performance although increasing feed conversion ratio. The reduction of the dietary P concentration worsened the feed efficiency ratio in diets not autoclaved. No significant interactions were observed between the level of phytase and autoclaving. The addition of phytase increased weight gain and feed intake in a dose dependent manner. Treatment of rye by autoclave improved metabolizable energy values without affecting digestibility of protein, while adding microbial phytase had no effect on the values of both energy and protein digestibility. The reduction of P level in diets decreased plasma concentration of Ca and P and did not affect the values of Fe and Zn, while reduced the ash concentration of toes. Moreover, the autoclave treatment improved the plasma concentration of Ca, but reduced P and also reduced values of toes ash percentages. However, microbial phytase addition increases ash and plasmatic P concentration. Reducing the level of P in the diet decreased the excretion of calcium and phosphorus and increased the retention of these two minerals. The autoclave treatment of the cereal had no effect on the excretion of both minerals while increased the Ca retention. However, the addition of microbial phytase improved the retention and reduced the excretion of Ca without affecting the corresponding P values. Lowering the level of P in the diet decreased yhe intake of Ca and P. The treatment of rye increased the intake of

minerals while adding phytase increased P intake without affecting the Ca intake. Significant interaction was observed between the phytase and treatment by autoclave of rye regarding intake of Fe.

In experiment 2, the reduction of dietary P and the autoclave treatment of wheat worsened the performance of chicks, while the autoclaving improved intestinal viscosity. Adding microbial phytase produced improvements in the performance of chicks without affecting intestinal viscosity. For energy, the autoclave treatment of wheat improved AMEn values without affecting digestibility of protein, while the microbial phytase improved the values of AMEn and AME and also improved the digestibility of protein. Treating wheat by autoclave had a positive effect on the plasma concentration of P without affecting plasma Ca content, and the opposite effect was found the level of P in the diets was reduced, lowering the plasma concentration of P. The addition of exogenous phytase increased plasmatic phosphorus particularly with high doses of enzyme. The ash concentration was reduced with low level P diets and was increased by the addition of phytase, while the autoclaving had no effect on their values. NPP-deficient diets tended to lower the excretion of P and Ca and increased their retentions. The P retention increased by the addition of microbial phytase, while its excretion was not affected either by the autoclaving or by microbial phytase addition. Nevertheless, the two factors (phytase and autoclaving) had negative effects on Ca retention, a significant interaction between phytase and wheat treatment by autoclave regarding Fe excretion was also observed. Reducing the level of NPP in the diet decreased the intake of P and Ca, while the P intake was improved by the autoclave treatment and by microbial phytase, whereas the intake of Ca was lowered by these two factors. Interactions were observed between the phytase and wheat treatment by autoclave regarding intake of Zn and Fe.

Keywords: Microbial phytase; Phosphorus; Broiler; Rye; Wheat; Endogenous phytase

Résumé

L'objectif de cette étude était d'étudier l'utilisation de deux niveaux de phytase microbienne dans deux régimes avec deux céréales employé sur les valeurs de performance, l'énergie, la rétention, l'excrétion et la consommation des minéraux. Deux expériences ont été réalisées, les deux avec le même design expérimental avec différent céréale utilisé dans les régimes alimentaires. Dans le premier essai a été utilisé le seigle et dans le deuxième essai le blé. Dans chaque essai ont été utilisé, deux cent quatre-vingt et huit poussins mâles de la souche Ross 308. Les poussins ont été attribués à 48 cages en deux batteries Petersime, avec nid chauffés électriquement, chaque répétition se composait de 6 animaux. Dans les deux essais, les huit traitements expérimentaux répliqués six fois et répartis pour blocs de façon aléatoire. Ont été utilisé quatre types de régimes alimentaires, selon le type de céréales utilisée (traités ou non traités par l'autoclave) et deux niveaux de phosphore inorganique (0,45% ou 0,27%) et avec l'addition ou non de deux niveaux de phytase microbienne (0, 500 et 5000 U / kg) pour les régimes déficits en phosphore. Il a été inclus 0,5% de l'oxyde de titanium (TiO_2) dans les régimes des deux essais comme un marqueur de la digestibilité. Analysé les effets de l'autoclavage par rapport à une alimentation avec des niveaux élevés de P par un ensemble de contraste et l'effet de la phytase sur l'alimentation avec un faible niveau de phosphore comme essai factoriel 3 x 2.

Dans l'expérience 1, l'autoclavage a entraîné une réduction de la viscosité intestinale et une meilleure réponse productive, mais aggravait l'indice de consommation. La réduction de la concentration du phosphore dans l'alimentation aggravait l'indice de consommation dans les régimes non traité par autoclave. Aucune interaction significative n'a été observée entre le niveau de la phytase et l'autoclavage. L'ajout de phytase augmente le gain de poids et la prise alimentaire d'une forme dose dépendante. Le traitement du seigle par autoclave, améliorait les valeurs de l'énergie métabolisable, sans affecté la digestibilité de la protéine, tandis que l'ajout de la phytase microbienne n'a eu aucun effet sur les valeurs de l'énergie et la digestibilité de la protéine. La réduction du niveau du phosphore dans les régimes alimentaires, réduisait la concentration plasmatique du P et du Ca, et n'a pas affectait les valeurs du Fe et du Zn, tandis que la concentration de cendres a été perturbé. En outre, le traitement par autoclave améliorait la concentration plasmatique du Ca, mais a réduisait celle du P, aussi les valeurs de cendres a été réduite. Cependant la phytase microbienne augmentait les valeurs des cendres et la concentration plasmatique du P. Egalement ont été observée des interactions significatives entre la phytase et le traitement du seigle concernant les concentrations

plasmatiques du P, Fe et le cendre des doigts. La baisse du niveau de P dans le régime alimentaire réduisait l'excrétion du Ca et du P et augmentait la rétention de ces deux minéraux. L'autoclave n'a eu aucun effet sur l'excrétion des deux minéraux, tout en conservant une augmentation de la rétention du Ca. Toutefois l'ajout de la phytase microbienne améliorait la rétention du Ca et réduisait leur excrétion sans affecter les valeurs du P. L'abaissement du niveau de P dans le régime alimentaire diminuait la consommation du Ca et P. Le traitement du seigle par autoclave, engendrait une consommation accrue des minéraux, tandis que l'ajout de la phytase augmentait la consommation du P et non le Ca. Concernant la consommation du Fe, il a été observé une interaction significative entre la phytase et le seigle traité par autoclave.

Dans l'expérience 2, la réduction du P et le traitement du blé par autoclave perturbait les paramètres productifs. L'autoclave a empiré la viscosité intestinale. L'ajout de phytase microbienne produit des améliorations dans les paramètres de production sans affecter la viscosité intestinale. Concernant l'énergie, le traitement du blé par autoclave améliorait les valeurs de EMAN sans affecter la digestibilité de la protéine, tandis que la phytase microbienne augmentait les valeurs de EMA et EMAN et aussi la digestibilité de la protéine. Traiter le blé par autoclave avait un effet positif sur la concentration plasmatique du P sans affecter la concentration du Ca, la réduction du phosphore des régimes alimentaires, avait un effet négatif sur le P plasmatique. L'ajout de phytase exogène augmentait le P plasmatique surtout avec des doses élevés. Concernant la cendre, leur concentration a été réduite avec des régimes déficits en NPP, l'ajout de la phytase microbienne tend à améliorer leur concentration, tandis que l'autoclave n'avait pas d'effet significatif. Les régimes déficits en NPP eu tendance à réduire l'excrétion du P et Ca et augmenté leurs rétentions. La rétention du P augmentait avec l'ajout de la phytase, tandis l'excrétion n'a pas été affecter ni par la phytase ni par l'autoclavage. Cependant, les deux facteurs (phytase, autoclave) ont eu des effets négatifs sur la rétention du Ca. En plus il a été observé une interaction significative entre la phytase microbienne et le traitement par autoclave du blé concernant l'excrétion du Fe. Réduire le NPP dans les régimes alimentaires, diminuait la consommation du P et Ca. La consommation du P a été améliorée pour l'ajout de la phytase microbienne et l'autoclavage du blé, tandis que la consommation du Ca a été perturbée par ces deux facteurs. Il a été observé des interactions entre la phytase et le traitement du blé par autoclave concernant la consommation du Zn et Fe. En général ne pas observer l'effet de la présence ou l'absence de la phytase endogène des deux céréales.

Mots-clés : Phytase microbienne ; Phosphore ; Poulet ; Seigle ; Blé ; Phytase endogène.

I- Revisión bibliográfica

I.1. Introducción:

En los últimos años, y debido a un aumento de las producciones intensivas de cerdos y aves en el marco de la UE, se han desarrollado muchos estudios intentando minimizar el impacto contaminante del exceso de nitrógeno (N) y fósforo (P) que las deyecciones de estos animales producen en el medio ambiente.

El fósforo es un mineral imprescindible para el crecimiento de los animales, debido a su influencia en el ciclo energético, en la formación de huesos y como regulador de la ingesta (**EMFEMA 2002**). El fósforo presente en los vegetales (base de la alimentación de las aves) se encuentra básicamente formando el ácido fítico, muy poco asimilable por los monogástricos. Estos últimos no producen la enzima fitasa que hidroliza el fitato y libera el fósforo a nivel intestinal. Por tal motivo, se suplementan las dietas con fósforo inorgánico (Pi), a menudo en exceso, que en parte revierte al medio ambiente, dando lugar a problemas medioambientales en áreas de gran concentración de producciones intensivas de animales (**Juanpere et al. 2005**).

Asimismo, se ha descrito que el fitato se liga a minerales como Zinc (Zn), Magnesio (Mg), Calcio (Ca), Sodio (Na) y También disminuye la actividad de la pepsina y es capaz a ligarse a proteasas endógenas, como la tripsina y la quimotripsina en el tracto gastrointestinal con lo cual se disminuye la digestibilidad de la proteína y los aminoácidos (**Selle et al. 2000**).

En la última década se ha estudiado el efecto que la incorporación de la enzima fitasa produce en el aumento de la biodisponibilidad del fósforo fítico (PP) (**Pérez-Vendrell et al. 2001**), con lo que se reduce la cantidad de fósforo inorgánico añadido a las dietas y, por tanto, la disminución del fósforo excretado. Se ha descrito que la incorporación de este enzima produce además mejoras de la disponibilidad de otros minerales (Ca, Zn, Cu, hierro (Fe), etc.) (**Selle. 2007**), pero dependientes del nivel del calcio y de vitamina D3 (**Selle.H.P.2009**). También se han descrito mejoras en la digestibilidad de la proteína y los aminoácidos (**Singh et al. 2008**).

Las fitasas son enzimas capaces de extraer el fósforo a partir del fitato y se encuentran presentes en plantas o son sintetizadas por microorganismos, e incluso algunos tejidos animales. Las fitasas vegetales (endógenas) tienen una importancia práctica relativa en la

alimentación de los animales. De hecho, son sensibles a los tratamientos térmicos aplicados en la fabricación de los alimentos (granulación) y poca actividad en pH ácido (**Beckers et al.2009**).Las fitasas microbianas son sintetizadas por bacterias, levaduras y hongos. Gracias a los avances en la ingeniería genética y la presión de algunas legislaciones sobre la liberación del fósforo en el medio ambiente, las fitasas comerciales, procedentes en su mayoría de hongos (*Aspergillus Níger* y *lycci Peniophora*), se han revelado muy útiles en los años 90 en la alimentación de aves y cerdos. En la actualidad, se incluyen al menos 500 unidades / kg de pienso, en la mayoría de los regímenes de cerdos y aves de corral (**Selle. 2007**).

I.2. El fosforo:

El fósforo es un elemento nutritivo esencial para los animales y las plantas, y naturalmente esta presentado en el medio ambiente. La actividad humana está ligada a unas aumentaciones de las concentraciones del fósforo acuáticas y terrestres. Esta acumulación del fósforo es nociva para el medio ambiente, y puede causar daños irreversibles.

Las fuentes de contaminación del medio ambiente por diferentes desechos se pueden clasificar en tres grandes categorías, que son, respectivamente, las relacionadas con desechos industriales, urbanos y agrícolas. El sector de la agricultura es cada vez más considerado como un actor clave en la contaminación del agua, aire y suelo por el fósforo, nitrógeno y amoniaco (NH₃). En efecto, con el fin de cumplir los requisitos de cultivos de alto rendimiento, los agricultores han recurrido a la utilización creciente de los fertilizantes minerales u orgánicos que vienen de las granjas de animales (aves y cerdos, bovino) (**Mellef. J et al, 2010**).

Los fertilizantes orgánicos que vienen de las granjas de animales, llevan muchos elementos nutritivos, principalmente el nitrógeno e el fósforo, la acumulación de este elemento en el suelo puede llevar consecuencias negativas para el medio ambiente. Los efectos negativos del aporte excesivo del fósforo en los distintos ecosistemas se caracterizan por un alto grado de eutrofización de lagos y ríos (**Mellef. J et al, 2010**).

Teniendo en cuenta su baja solubilidad, el fósforo tiende a asociarse con las partículas del suelo, facilitando así la erosión y la contaminación de las aguas superficiales (**Souchere.V. 2003**). La lixiviación del fósforo de las tierras agrícolas a los ríos y lagos, permite en presencia de nitrógeno, el crecimiento de las algas y plantas acuáticas. Este es

la causa del empobrecimiento del agua en oxígeno y la mortalidad de los peces (**Mellef. J et al, 2010**).

Como se ha establecido que el exceso de los elementos nutritivos era perjudicial para el medio ambiente, muchos países han establecido leyes y regulaciones para reducir y limitar la eliminación del fósforo en el entorno. En particular, para reducir la emisión del fósforo y la contaminación del agua, el estado de Maryland (EE.UU) ha introducido una legislación para mejorar la calidad del agua (Water Quality Improvement Act, 1998), que afirma que todos los alimentos de monogástricos deben incluir fitasa para reducir la incorporación del fósforo inorgánico, además hay técnicas de alimentación que se han puesto en práctica en las granjas de aves para controlar o reducir las emisiones del fósforo (**Mellef. J et al, 2010**).

I.2.1-Estrategias para reducir la emisión de fosforo en pollos de engorde:

En muchas zonas, la alimentación de los pollos de engorde se compone principalmente de maíz y harina de soja. Sin embargo, los dos tercios del fósforo de estas plantas encuentra en forma de ácido fitico, que es poco disponible para los animales monogástricos. La importancia del fósforo en la formación ósea y en el metabolismo de la energía de las aves, hace que sea necesaria la adición de este elemento en forma inorgánica a los piensos (**Mellef. J et al, 2010**).

Las diferentes formas de fósforo inorgánico comúnmente utilizados en la alimentación de pollo son fosfato bicálcico (18,7% P), fosfato monocálcico (21% P) y fosfatos desfluorados (18% P) (**Mellef. J et al, 2010**).

Además de disponer de diferentes fuentes de fósforo orgánicos e inorgánicos, las nutricionistas utilizan grandes márgenes de seguridad para la proporción del fósforo con el fin de evitar desequilibrios y deterioro del rendimiento relacionados con la deficiencia de este elemento (**Mellef. J et al, 2010**). Por lo tanto, cuando la ingesta del fósforo es superior a las necesidades de las aves, el exceso, es principalmente en forma de fosforo fitico será rechazada en el estiércol.

Se han implementado varios enfoques dietéticos para reducir los aportes de fósforo inorgánico en la alimentación de pollos, sin perjudicar el rendimiento de los animales y, al mismo tiempo, reducir los riesgos ambientales.

I.2.1.1-Alimentación multifase:

Sabiendo que las necesidades de las aves disminuyen con la edad y el estado fisiológico, el uso de varias dietas sucesivas durante el crecimiento en la misma granja permite satisfacer las necesidades reales de los animales y evitar los excesos (**Mellef. J et al, 2010**). Los requerimientos del fósforo en pollos de engorde disminuyen a partir de tres a cuatro semanas de edad, por lo tanto se puede utilizar concentraciones más bajas de fosforo que las recomendadas por el National Research Council (NRC.1994), el paso a programas alimentarios con cuatro o incluso cinco fases reduce aún más el consumo del fósforo (**Angel et al. 2005**).

I.2.1.2-Selección de las materias primas:

La elección de las materias primas debe ser dirigida a los ingredientes altamente digestibles y con bajo contenido en fitato. El uso de maíz con alto contenido de fósforo disponible (HAPC) que contiene menos del 50% de fitato que las dietas basadas en maíz estándar, es otro enfoque para reducir el nivel del fósforo en los alimentos. En efecto, la HAPC es un maíz genéticamente modificado para que contenga 0,27% de fósforo total con 0,17% de fósforo disponible, en comparación con el maíz convencional con la misma tasa de fósforo total, pero sólo con 0,03% de fósforo disponible (**Waldroup, 2000**).

I.2.1.3- Valorización del fosforo fitico por la adición de aditivos:

Las investigaciones recientes sugieren que las recomendaciones del NRC (1994) del fosforo no fitico (PNP) para pollos de engorde superan los requisitos (**Angel et al. 2005**). Los aditivos para piensos tales como la fitasa, la vitamina D3 y el ácido cítrico mostraron una disminución de la suplementación del fósforo inorgánico, mediante la mejora de la utilización del fósforo fítico de las dietas (**Powers. W. 2008**). Debido a esta mejora de la digestibilidad del fósforo por efecto de la fitasa, el fósforo no fítico en las dietas de las aves se puede reducirse en 0,10 a 0,20 puntos porcentuales sin ningún efecto significativo en el rendimiento (**Woyengo. 2011**).

Los metabolitos de la vitamina D3 tales como la 25-hidroxicolecalciferol, la 1 α -hidroxicolecalciferol y 1,25-dihidroxicolecalciferol, incrementan la disponibilidad del fosforo fitico, cuando se utilizan solo o en combinación con la fitasa. La inclusión de 500 U/kg de fitasa microbiana a base de *Aspergillus Ficum* y 70ug/kg de 25-hidroxicolecalciferol, fue equivalente a 0.09% de PNP (**Angel et al. 2005**)

El ácido cítrico es otro aditivo que ha mostrado una mejora en la utilización del fósforo en los pollos. Como se ha reportado por **Ebrahimnezhad et al. (2011)**, la adición de 2.5% y 5% de ácido cítrico en dietas deficientes en fósforo a base de maíz y harina de soja, aumentó la digestibilidad del fósforo y mejoró a 20% el contenido de las tibias en este mineral.

La tasa de hidrólisis del fósforo fítico depende fuertemente de la cantidad de fitasa añadida, de las concentraciones del fósforo no fítico, el calcio, la vitamina D3 y de la relación Ca: P (**Quian et al, 1997**) (**Narcy et al. 2009**).

I.3. Requerimientos del fosforo:

El fósforo es esencial para el mantenimiento y el funcionamiento normal del cuerpo. Está presente en muchos órganos y tejidos, en donde su función es muy variable (estructural en el hueso como la hidroxiapatita y las membranas celulares, regulador en otros tejidos y órganos) (**EMFEMA. 2002**).

Aproximadamente el 80% de fósforo del cuerpo se encuentra en el esqueleto, el restante 20% está contenido en los nucleótidos, tales como ATP, ácidos nucleicos, fosfolípidos y otros compuestos fosforilados necesarios para el metabolismo (**Narcy et al. 2009**).

Una deficiencia de fósforo puede causar una reducción en la mineralización ósea y por lo tanto una disminución de la resistencia ósea. Además, una deficiencia de fósforo reduce el consumo de alimentos, lo que conduce a una reducción en la ganancia de peso de los animales (**Saxena, 1996**).

Debido a que el fósforo es crucial para la integridad del esqueleto y el rendimiento del crecimiento, los nutricionistas tienden a incorporar niveles de fósforo moderadamente excesivos en la alimentación de aves para garantizar un margen de seguridad (**Waldroup, 1999**). Sin embargo, como el fósforo excretado está en función del fósforo total, las dietas actuales de aves deberán contener la mínima cantidad de fósforo que permita correctamente sostener la producción, en reconocimiento de los problemas ecológicos. En consecuencia, la validez de las recomendaciones estándar para los niveles de fósforo dietético ha convertido en objeto de revisión (**Mellef. J et al, 2010**).

Recientemente los requerimientos de fósforo fueron revisados por (**Angel, 2009**). La recomendación de fósforo no fítico del NRC (1994) para pollos de engorda está basada en los expertos publicadas entre 1952 y 1983. Sin embargo, las aves comerciales actuales

son muy diferentes a las que se encontraban disponibles antes de 1983, debido en parte a la selección genética, pero también a los cambios en el manejo alimenticio (**Selle et al. 2007**). Las estirpes comerciales actuales son más eficientes en la utilización de nutrientes, y las dietas comerciales son formuladas de una manera más adecuada para cubrir el rápido crecimiento de los pollos (**Narcy et al. 2009**). Por ejemplo, el NRC (1994) recomienda un rango en los requerimientos para PNP de 4,5 g/ kg (0-3 semanas), 3,5 g/ kg (3-6 semanas) a 3,0 g/ kg (6-8 semanas) en las dietas de pollos de engorde.

A partir de un estudio detallado de los pollos (0-21 días), **Waldroup et al. (2000)** afirmó que sobre la base de cenizas de las tibias, el requisito de PNP es de 3,9 g /kg para las dietas basadas en maíz normal, y que se reduce a 2,9 g/kg con la suplementación 800 FTU/kg fitasa. Para las dietas a base de maíz alto en fósforo disponible, los requisitos correspondientes son 3,7 y 3,2 g PNP/kg.

La definición exacta de las necesidades de fósforo en las aves es inherentemente difícil y se ha complicado más por la introducción de fitasas microbianas. Por otra parte, hay que señalar que estas recomendaciones dependen de los niveles recomendados de Ca que juega un papel importante en la disponibilidad del fósforo (**Narcy et al. 2009**).

I.4. El calcio:

Un mineral muy íntimamente ligado al fósforo es el calcio. Normalmente, los dos minerales se estudian conjuntamente ya que van unidos tanto en los alimentos como en el metabolismo del organismo. El calcio es el elemento mineral más abundante en el organismo animal. El 99% de la cantidad total se encuentra en los huesos y los dientes. El resto se encuentra en los fluidos y los tejidos blandos del organismo (**Juanpere.J. 2006**).

El calcio aparece como un ión libre, unido a las proteínas del suero y formando complejos con ácidos orgánicos e inorgánicos. El calcio ionizado es esencial para diferentes funciones como la conducción de corrientes nerviosas y el mantenimiento de la contracción y relajación muscular, incluido el músculo cardíaco. Puede actuar como activador o estabilizador de algunas enzimas y es preciso para la coagulación normal de la sangre. La principal fuente del calcio es el carbonato cálcico (CaCO_3), otras fuentes importantes son las harinas animales (**Juanpere.J. 2006**).

Los cerdos y aves parecen ser tolerantes a dietas con cocientes elevados de Ca: P. El cociente óptimo para estos animales varía entre 1:1 y 2:1, siendo bien tolerados cocientes inferiores a estos y mal tolerados cocientes superiores a 3:1(**Dieckmann y col., 2002**).

La deficiencia de calcio en pollos de engorde tiene como síntomas más habituales la disminución del consumo de pienso, un crecimiento pobre, morbosidad, deformidades de los huesos, aumento de la velocidad metabólica basal y una susceptibilidad aumentada a tener hemorragias internas (**Saxena, 1996**).

I.5. EL fitato:

El ácido fítico se encuentra naturalmente en los alimentos de origen vegetal como fitato, donde sirve como la forma de almacenamiento de fósforo. El descubrimiento de la molécula de ácido fítico data de 1855-1856, cuando Hartig aisló pequeñas partículas desprovistas de almidón en semillas de algunas plantas. En 1872, Pfeffer caracterizó estas partículas más ampliamente comprobando que eran partículas de superficie lisa, forma esférica, libres de nitrógeno y sugirió que eran una combinación de fósforo y carbohidratos (**Frontela Saseta et al. 2007**).

El ácido fítico es el principal antinutriente presente en los cereales. Se sabe que se halla presente a altas concentraciones en granos de cereales y en legumbres (1-2 %), y puede inhibir de forma significativa la absorción de minerales mediante la formación de complejos insolubles con minerales de interés nutricional, como el hierro, el calcio y el zinc (**Hurrell et al., 1992**), impidiendo su absorción y alterándose de este modo la homeostasis mineral. Los seis grupos fosfato en la molécula de ácido fítico, le otorgan una elevada capacidad quelante de cationes divalentes (**Figura 1**).

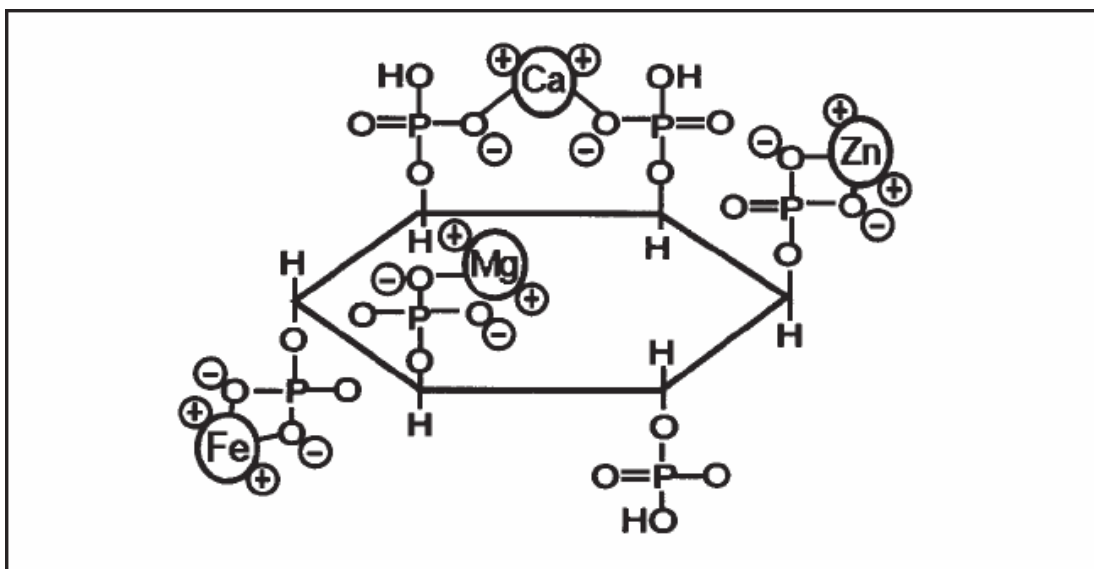


Figura 1: Estructura del ácido fítico (Leeson, S.2005).

El ácido fítico (mio-inositol hexafosfato; IP6) es en las plantas el mayor depósito de fósforo de que éstas disponen, ya que del fósforo total presente en las plantas, un 60-90% se encuentra en forma de fitato (Cheryan, 1980). Es sintetizado a partir de glucosa 6-P, y se localiza en los granos y semillas de cereales, legumbres y oleaginosas; encontrándose también en el polen, tubérculos, frutas y otros vegetales (Frontela Saseta et al. 2007). Las variaciones en el contenido de ácido fítico que se producen como consecuencia de las condiciones, localización y año de cultivo, aplicación de fertilizantes y variedad del cultivo se ha comprobado en distintos cereales y legumbres (Steiner et al. 2007). Un resumen de los estudios para el contenido en el ácido fítico de los ingredientes principales de la alimentación se muestra en la (Tabla 1).

I.5. Aspectos negativos del fitato :

La Tabla 2 presenta una visión general sobre los impactos negativos del fitato sobre los diferentes nutrientes y su modo de acción.

I.5.1-Iones minerales:

El ácido fítico puede reducir la absorción, de minerales y por consiguiente su disponibilidad para los animales, lo que podría explicar en parte la reducción de los parámetros productivos por parte del ácido fítico (Woyengo. 2013).

Tabla 1: Media ponderada (y rango) de las concentraciones de P total y de PP, y proporción de PP al P total, en ingredientes base de piensos para aves (Selle et al, 2007).

Feed ingredient	Number of data-sets/samples	Total P (g kg ⁻¹)	Phytate-P (g kg ⁻¹)	Proportion (%)
Cereals				
Barley	4/41	3.21 (2.73–3.70) ^a	1.96 (1.86–2.20) ^a	61.0 (59–68) ^a
Maize	7/45	2.62 (2.30–2.90)	1.88 (1.70–2.20)	71.6 (66–85)
Sorghum	5/41	3.01 (2.60–3.09)	2.18 (1.70–2.46)	72.6 (65–83)
Wheat	6/97	3.07 (2.90–4.09)	2.19 (1.80–2.89)	71.6 (55–79)
Oilseed meals				
Canola meal	4/28	9.72 (8.79–11.50)	6.45 (4.00–7.78)	66.4 (36–76)
Cottonseed meal	3/21	10.02 (6.40–11.36)	7.72 (4.9–9.11)	77.1 (70–80)
Soyabean meal	6/89	6.49 (5.70–6.94)	3.88 (3.54–4.53)	59.9 (53–68)
By-products				
Rice bran	6/37	17.82 (13.40–27.19)	14.17 (7.90–24.20)	79.5 (42–90)
Wheat bran	6/25	10.96 (8.02–13.71)	8.36 (7.00–9.60)	76.3 (50–87)

a: rango de los valores.

Se ha encontrado que la digestibilidad del fósforo fítico en aves es mas baja que 10% (Cowieson et al. 2006), el fósforo no absorbido se elimina via heces lo que puede dar lugar a la contaminación del medio ambiente. El ácido fítico también puede reducir la digestibilidad de otros minerales debido a que en su estado natural en las plantas, forma un complejo con minerales en globoides dentro de cuerpos proteicos. Además, debido a sus cargasnegativa en condiciones de pH ácido, neutro y básico, el acido fitico puede formar complejos en todas las condiciones de pH en el tracto gastro-intestinal, reduciendo de ese modo la biodisponibilidad de los cationes, especialmente cationes divalentes, que forman complejos insolubles con acido fitico en condiciones de pH intestinal bajo (Woyengo. 2011).

1.5.2. Efecto en la disponibilidad de proteína y aminoácidos:

Un mecanismo por lo cual el acido fitico puede afectar negativamente la digestibilidad de aminoacidos antes la ingestión de la dieta ha sido propuesto. El acido fitico en el estado natural forma complejos con aminoácidos, minimizando la disponibilidad y la digestibilidad de estos nutrientes. Los grupos amino terminales de las proteínas y los grupos amino libres de aminoacidos poseen cargas positivas a pH por debajo del punto isoeléctrico (pH < 5). En consecuencia, a pH ácido en el pro-ventrículo y ventrículo de aves, el acido fitico puede interactuar con la proteína directamente y formar enlaces electrostáticos, reduciendo así la disponibilidad de proteínas. Porotra parte, las proteinas poseen unacarga negativa neta a pH por encima del punto isoelictrico pero por debajo de

pH 10. Por lo tanto, en el intestino delgado, donde el pH está en el intervalo de 5 a 10, ácido fítico puede unirse con la proteína a través de cationes multivalentes para formar un complejo de fitato-mineral-proteína que es resistente a la hidrólisis enzimática. Además, las enzimas endógenas proteolíticas, como cualquier otra proteína, pueden ser ligados por el ácido fítico, tanto en el estómago como en el intestino delgado, lo que reduce su capacidad para digerir las proteínas alimentarias (Woyengo. 2011).

1.5.3. Efecto en la digestibilidad de la energía :

La unión directa de moléculas generadoras de energía, tales como hidratos de carbono, lípidos y proteínas con el ácido fítico pueden reducir la digestibilidad de la energía. El ácido fítico también puede reducir indirectamente la digestibilidad de la energía por su unión con las enzimas endógenas con cofactores metálicos de las enzimas implicadas en la hidrólisis de las moléculas generadoras de energía, y por el aumento de la secreción endógena de Na, que está implicado en la absorción de la glucosa y aminoácidos en el tracto gastro-intestinal (Woyengo. 2011).

Tabla 2 : Las interacciones negativas del fitato y los nutrientes en los alimentos

(Kumar.V. 2010).

Nutrientes	Modo de acción
Iones minerales (zinc, hierro, calcio, magnesio, manganeso y cobre)	Formación de complejos fitato-minerales que conduce a la disminución de la disponibilidad de los minerales
Proteínas	Formación de un complejo no específico proteína-fitato que no se hidroliza fácilmente por enzimas proteolíticas
Carbohidratos	La formación de complejos de carbohidratos- fitato implica que los carbohidratos sean menos degradables. La inhibición de la actividad de la amilasa por formación de un complejo con iones Ca, disminuye la degradación de los carbohidratos.
Lípidos	La formación del complejo 'lipofitina', puede dar lugar a jabones metálicos en la luz intestinal, dando como resultado la baja disponibilidad de lípidos

I.6. La fitasa:

El término fitasa (mio-inositol hexafosfato hidrolasa) se define como una clase de fosfatasas con la capacidad de liberar in vitro al menos un fosfato del ácido fitico, liberando de este modo el fosfato y los fosfatos de inositol y bajando potencialmente los minerales quelados (**Bohn et al.2008**).

Aunque la actividad de fitasa se detectó por primera vez en el salvado de arroz hace casi un siglo (**Suzuki et al., 1907**), los intentos de desarrollar una enzima fitasa en la alimentación no comenzó hasta 1962 en América del Norte. Este interés se reflejó en diferentes publicaciones contemporáneas, que estaban preocupándose por los efectos negativos de los fitatos sobre la disponibilidad del fósforo y el calcio en los pollos de engorde. Sin embargo, hasta 1991 no estuvo comercialmente disponible por primera vez la enzima fitasa en la alimentación de los animales, que era en gran parte, en respuesta a la legislación destinada a limitar la contaminación del medio ambiente con el fósforo en los Países Bajos (**Selle et al, 2007**).

La identificación compleja, la producción y las características de las enzimas fitasas ha sido objeto de varios trabajos de revisión, incluyendo (**Liu. B.L. (1998)** y **Haefner et al. (2005)**).

Las fitasas están ampliamente distribuidas en las plantas, animales y microorganismos (bacterias y hongos). La Unión Internacional de Bioquímicos reconoce actualmente dos clases de enzimas de fitasa: un 3-fitasa (EC 3.1.3.8) y un 6-fitasa (EC 3.1.3.26), que inician la defosforilación de PP en diferentes posiciones en el anillo de inositol y producen los diferentes isómeros de los fosfatos de inositol inferiores (**Angel et al. 2002**).

No existe una unidad estándar internacional para la medición de la actividad de la fitasa, lo que conlleva una gran confusión en la industria de los alimentos comerciales y en las comparaciones de la eficacia de diferentes fuentes de fitasa (**Selle et al, 2007**).

La unidad de medida definida de la actividad de fitasa depende de las condiciones de los ensayos que incluyen la concentración de sustrato (fitato de sodio) utilizado, la temperatura y el pH (**Selle et al, 2007**).

La actividad de fitasa se define como unidades de fitasa (FTU), donde una FTU presenta la cantidad de enzima que libera 1 micromol por minuto de fosforo inorgánico de ácido fítico a pH 5.5 y 37°C (**Englen. 1994**).

Esta definición proporciona una medida útil de la cantidad de la fitasa activa y representa un simple punto de referencia bajo las condiciones de ensayo bien definidas (**Selle et al, 2007**).

Se ha afirmado que los microorganismos producen normalmente las 3-fitasa, y que las 6-fitases se encuentran normalmente en las plantas. Sin embargo, se han descrito excepciones a esta regla general. Por ejemplo, se ha encontrado una enzima con actividad 3-fitasa en la soja, y una enzima con actividad de 6-fitasa en *Escherichia coli*. Las fitasas microbianas tienden a tener un pH óptimo en el intervalo de 2 a 6, mientras que las fitasas vegetales tienden a tener un pH óptimo alrededor de 5 (**Angel et al. 2002**).

Hay 4 posibles fuentes de fitasa que se pueden encontrar en el tracto digestivo de los animales: (**Angel et al. 2002**) (Tabla 3).

- ❖ Fitasas intrínsecamente presentes en los ingredientes.
- ❖ Fitasas exógenas de origen microbiano añadidas a las dietas.
- ❖ fitasas producidas por la microflora presente en el tracto gastrointestinal.
- ❖ fitasas generadas por la mucosa del intestino delgado.

I.6.1. Fitasa de las plantas:

La fitasa se encuentra en arroz, trigo, maíz, soja, semillas de maíz, lechugas, frijol arbustivo, habas, el centeno y otras leguminosas u oleaginosas (**Kumar.V. 2010**). Sólo las fitasas de trigo, colza y la soja han sido purificadas hasta la homogeneidad y se han caracterizado ampliamente. En la germinación de las semillas o el polen, la fitasa parece ser responsable de la degradación de la fitina. El aumento de la actividad de la fitasa es concomitante con una disminución en el contenido de ácido fítico durante la germinación (**Liu. B.L. 1998**).

I.6.2. Fitasa microbiana:

Las fitasas microbianas se han utilizado desde hace casi 20 años en la alimentación animal y actualmente se encuentran en casi un 95% en la alimentación de los pollos (**Narcy et al. 2009**).

Se han examinado varios microorganismos productores de fitasa. La mayoría de ellos son bacterias tales como *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas* y *Klebsiella*. Generalmente, la enzima se prepara por una precipitación con sulfato de amonio o con una etapa de ultrafiltración seguida de intercambio iónico y cromatografía de filtración en gel (Liu. B.L. 1998).

Los hongos y las bacterias son las fuentes más importantes de fitasa. El primer informe sobre la fitasa de la levadura fue en 1984 (Kumar.V. 2010). Más tarde, varias cepas de levadura fueron seleccionadas por su capacidad para hidrolizar fitatos. La mayor parte de las fitasas producidas comercialmente, provienen de *Aspergillus niger*, *A. Ficum*, *A. Fumigatus* y *A. Penicillium* (Liu. B.L. 1998).

I.6.3. Fitasa de la microflora intestinal:

Este grupo de fitasas había sido descrito predominante en cerdos. Algunos autores detectaron la hidrólisis del fitato por la fitasa de la microflora intestinal en el intestino grueso de los cerdos (Kumar.V. 2010). Sin embargo, en los humanos, un gran número de bacterias presentes en el colon son capaces de degradar el fitato, en cierta medida, pero esto está inversamente relacionado con la ingesta de calcio. Hasta hora, son pocos los estudios que recomiendan la inclusión de esta enzima como aditivo alimentario (Kumar.V. 2010).

I.6.4. Fitasa derivada de la mucosa del intestino delgado:

La actividad fitasa de la mucosa intestinal se describió inicialmente en el yeyuno de los cerdos. Estudios sobre los seres humanos demostraron que la actividad de fitasa es más baja en el intestino delgado donde tiene una capacidad limitada para degradar el fitato. Curiosamente, muchos animales, incluyendo los seres humanos, tienen la capacidad de adaptación para aumentar la actividad de fitasa intestinal y de las fosfatasas cuando se ofrece un nivel deficiente de fósforo inorgánico en las dietas (Kumar.V. 2010).

I.7. Función catalítica:

Las fitasas son enzimas fosfatasas que poseen la capacidad de catalizar la hidrólisis de los enlaces éster fosfato. Las fitasas son capaces de hidrolizar uno o más fosfatos del ácido fitico, produciendo fósforo inorgánico y una serie de ésteres de fosfatos más bajos (inositol pentafofato e inositol monofosfato como productos intermedios) (Angel et al. 2002). (Figura 2).

Como se demostró por la Unión Internacional de Bioquímica hay dos tipos de fitasa. Las 3-fitasas inician la defosforilación de fósforo fitico en la posición 3, obteniéndose 1, 2, 4, 5,6-pentafosfato y fósforo inorgánico, mientras que las 6-fitasas inician la defosforilación en la posición 6, produciendo 1, 2, 3, 4,5-pentafosfato y fósforo inorgánico. Las 3-fitasas no siempre defósforilan completamente el ácido fitico, mientras que los 6-fitasas lo hacen (Angel et al. 2002).

Tabla 3: Características generales de la fitasa de diversas fuentes (Liu. B.L. 1998).

Classification	Source	Molecular weight (kDa)	Optimal temperature (°C)	Optimal pH [pI]	Reference
Bacteria	<i>B. subtilis</i>	36–38	60	6.0–6.5 [6.25]	66, 78
	<i>E. coli</i>	42	55	4.5	26
	<i>Enterobacter</i>	–	50	7.0–7.5	104
	<i>K. aerogenes</i>	10–13, 700	60–70	4.5, 5.2 [3.7]	87
	<i>Pseudomonas</i>	–	–	5.5	37
Fungi	<i>A. ficuum</i>	85–100	55–60	4–6 [4.5]	34, 38, 92
	<i>A. niger</i>	200	53	5.5	80
	<i>A. terreus</i>	214	70	4.5	101, 102
	<i>A. oryzae</i>	120–140	50	5.5 [4.5]	79
	<i>R. oligosporus</i>	–	55	4.5	64
Yeast	<i>S. castellii</i>	490	77	4.4	75
	Bakers' yeast	–	45	4.6	59
Plant	Canola seed	–	50	5.2	31
	<i>Cucurbita maxima</i>	66.5	48	4.8	22
	<i>Lilium longiflorum</i>	88	55	8.0	74
	Maize	76	55	4.8	44
	Mung beans	160	57	7.5	53
	Soybean	60	55	4.5–4.8 [5.5]	20, 85
	Spelt	68	45	6.0	41
	Wheat bran	47	55	5.0–5.6, 7.0	50, 57, 64
Animal tissue (intestinal mucosa)	Human	–	–	7.4	5
	Chicken	–	–	8.2	5
	Calf	–	–	8.7	5
	Rat	70–90	–	7.0, 7.5–7.8	5, 103

Los productos finales principales de la acción de la fitasa son el ácido fosfórico y mio-inositol (Liu. B.L. 1998).

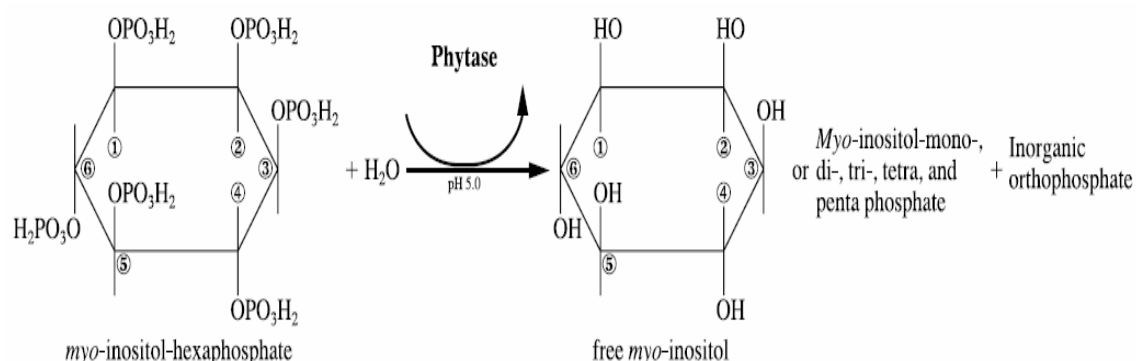


Figura 2: actividad catalítica de la fitasa sobre el ácido fitico (Liu. B.L. 1998).

I.8. Características de la fitasa:

La actividad fitasa se mide generalmente por la cantidad de fosfato inorgánico liberado por minuto a partir de un sustrato seleccionado, a temperatura y pH definidos. Al igual que otras enzimas, la actividad fitasa se ve afectada por las propiedades inherentes de la enzima y las condiciones de la reacción. Las siguientes propiedades de la fitasa son de importancia práctica:

I.8.1. pH y temperatura óptima:

Las fitasas más utilizadas tienen un pH óptimo en el rango de 4.5 a 6, a diferencia de la fitasa de *Bacillus sp*, tiene un pH óptimo neutral o alcalino. La fitasa de *A. Nigers* caracteriza por presentar dos pH óptimos a 2.2 y 5.5 respectivamente, y una caída de la actividad entre estos dos puntos (**Han y Lei 1999**). La temperatura óptima de las fitasas de plantas y microbianas está en el rango de 40 a 60°C. Esta temperatura óptima relativamente alta no permite la actividad completa de las fitasas en el estómago de los cerdos y aves (**Lei et al 2003**).

I.8.2. Termoestabilidad:

La termoestabilidad de una fitasa determinada es como las otras proteínas. Debido a que los piensos comerciales son a menudo granulados con procesos que utilizan altas temperaturas (60 a 80°C) y con vapor, es conveniente que las enzimas sean termoestables para evitar una pérdida sustancial de la actividad durante este proceso (**Lei et al 2003**).

El revestimiento químico de las fitasas se ha utilizado para mejorar su estabilidad al calor, pero el recubrimiento puede comprometer tanto la liberación y la función de las enzimas en el estómago. Pulverizar preparaciones de fitasa líquida en el alimento después la granulación puede ser una alternativa de la pérdida de actividad de fitasa por la granulación, pero aumenta los costos de mano de obra y equipo (**Lei et al 2003**).

I.8.3. Resistencia a la proteólisis:

Una fitasa efectiva necesita tener una fuerte resistencia a la degradación hidrolítica por proteasas digestivas en el tracto digestivo. Las fitasas fúngicas y bacterianas muestran diferentes sensibilidades a la pepsina y tripsina (**Rodríguez et al. 1999**), y las fitasas bacterianas parecen tener una mayor resistencia a la degradación proteolítica que las primeras (**Igbasan et al. 2000**).

I.9. Beneficios nutricionales de la fitasa:

I.9.1. Parámetros productivos:

Desde el informe de **Simons et al. (1990)**, se han completado varios cientos de investigaciones sobre los efectos de las diversas fitasas microbianas sobre el crecimiento de las aves de corral. La adición de fitasa a dietas inadecuadas en Fósforo ha mostrado, de forma consistente, una mejora de los parámetros productivos (**Selle et al. 2007**).

Nelson et al. (1971) fue el primer en suplementar 0,4% de fitasa cruda (producida por *Aspergillus ficcum* NRRL 3135) en las dietas de pollos de engorde a base de maíz y harina de soja que contenían 0,24 % de fósforo fítico natural, y registró una mejora de la ganancia del peso de 33,3%.

En el estudio de **Simons et al. (1990)**, la adición de una fitasa (1500 U/kg) a las dietas que contenían 4,5 g /kg de P total incrementó la ganancia de peso (733 g frente 338 g) y la eficiencia alimentaria (1,50 frente 1,85) de pollos de engorde de 0 a 24 días de edad.

Posteriormente, **Cabahug et al. (1999)** informó que la adición de una fitasa (400 y 800 U/ kg) a dietas con 2,3 g/ kg de fósforo no fítico aumentó la ganancia de peso (18,8%), el consumo del alimento (9%) y la eficiencia alimentaria (7,9%) de los pollos de engorde de 7 a 25 días de edad. La mejora observada en la tasa de crecimiento se atribuye al aumento de la biodisponibilidad del fósforo por efecto de la fitasa. En general, las respuestas a la fitasa en el consumo y la ganancia del peso son más robustas y consistentes que las respuestas de la eficiencia alimentaria (**Selle et al. 2007**).

A partir de los análisis multifactoriales de pruebas de alimentación con fitasa, se ha argumentado que las respuestas de la eficiencia alimentaria a la fitasa han ido disminuyendo con el tiempo, lo que se atribuye a las mejoras simultáneas en las estirpes de pollos, a los alimentos y a las técnicas de gestión. Por lo tanto, parece que las especificaciones nutricionales de las dietas, la concentración del fitato y el nivel de inclusión de la fitasa son los variables críticos interaccionadas (**Singh. 2008**) (**Selle. 2007**). En un estudio descrito por **Selle et al. (1999)**, se suministraron dietas a base de un sorgo estándar y uno modificado a los pollos entre 7 y 25 días, sin o con 600 U/kg de fitasa. Las dietas modificadas han sido reducidas de Ca, P, proteína/aminoácidos y densidad energética. La fitasa no influyó en el crecimiento de los pollos alimentados con las dietas estándar, pero aumentó significativamente la ganancia de peso (7,6%) y la eficiencia alimentaria (4,7%) en dietas modificadas.

Es probable que los altos niveles de las especificaciones nutricionales empleadas en el ensayo puedan acomodar a las propiedades anti-nutritivas de las concentraciones del fitato en la dieta y observar una respuesta negativa a la suplementación de fitasa (**Selle. 2007**).

I.9.2. Disponibilidad de proteínas y aminoácidos:

Durante la última década, una serie de grupos en Australia, Europa y América del Norte han investigado los efectos de la adición de fitasa en la digestibilidad de los aminoácidos y del nitrógeno en dietas para cerdos y aves.

El ácido fítico interfiere en la digestibilidad y disponibilidad de las proteínas, y su efecto depende de las características del complejo ácido fítico-proteína formado, el cuál varía en función del tipo de proteína, del pH y de la temperatura. Existen discordancias en los resultados obtenidos sobre la interacción entre el ácido fítico y las proteínas; éstas podrían estar debidas a la distinta naturaleza de las proteínas presentes en los alimentos, mientras que otros autores han atribuido este efecto negativo a la capacidad que presenta el ácido fítico de inhibir enzimas digestivas con actividad proteolítica (**Frontela Saseta. 2007**).

La medida en que la fitasa genera mejoras en la digestibilidad de la proteína y aminoácidos en aves de corral es variable y el tema sigue siendo controvertido. La variabilidad observada parece provenir de un número de factores que incluyen:

- ❖ la elección de marcador inerte utilizado en los ensayos de digestibilidad.
- ❖ Diferencias entre los tipos de ingredientes.
- ❖ los niveles dietéticos de Ca y PNP, y algunas pruebas sugiere que el balance electrolítico dietético (BED) puede estar implicado.

Otros factores que probablemente afectan son: la edad de las aves, la digestibilidad inherente de los aminoácidos de la dieta, las fuentes y concentraciones de fitato en la dieta, y el nivel de inclusión y el tipo de fitasa añadida (**Selle. 2007**).

Como se ha mencionado, el ácido fítico inhibe la digestibilidad y la disponibilidad de la proteína y los aminoácidos en ciertas condiciones, como ocurre en las aves al pH ácido del proventrículo. Como la fitasa exógena es principalmente activa en el buche, se deduce que la fitasa impide parcialmente la formación de complejos de fitato-proteína por la hidrólisis previa del fitato (**Selle. 2007**).

Varios estudios han demostrado que las mejoras en el crecimiento después de la adición de fitasa en dietas bajas en fósforo, puede ser consistente con una mejora de la disponibilidad de proteína. **Ravindran et al. (2000)** examinaron los efectos de la adición de fitasa en la digestibilidad de aminoácidos de las dietas de pollos de engorde basado en una mezcla de trigo y sorgo con dos niveles de fósforo disponible. La fitasa incrementó la digestibilidad de los aminoácidos evaluados, pero los efectos fueron más pronunciados en las dietas bajas en fósforo.

Se ha concluido que, la adición de fitasa mejoró la utilización de proteínas en las aves por inactivación de las propiedades anti-nutritivas de ácido fítico. Por lo tanto, estos datos apoyan la hipótesis de que la fitasa tiene un efecto positivo en la disponibilidad de proteínas en aves. En contraste con estas diversas respuestas positivas, algunos autores encontraron que la fitasa adicionada a las dietas de pollos no tuvo efectos positivos sobre la digestibilidad de la proteína y los aminoácidos (**Augspurger y Baker, 2004**).

I.9.3. Factores influyen el efecto de la fitasa en la utilización de proteína y aminoácidos:

I.9.3.1. Elección de marcador inerte:

Se ha demostrado de manera concluyente, que las respuestas de digestibilidad de los aminoácidos a la fitasa son más pronunciadas cuando se utiliza el óxido de titanio como marcador inerte en comparación con el óxido crómico. Por lo tanto, la recomendación de **Jagger et al. (1992)** que el óxido de titanio se debe preferir a óxido crómico como marcador en estudios de digestibilidad de nutrientes asume importancia. El óxido crómico puede no distribuirse uniformemente en la digesta a lo largo del tracto gastrointestinal. Una limitación adicional al óxido crómico como marcador dietético es la pobre repetibilidad y la variabilidad de sus métodos analíticos. Por otra parte, es posible que los resultados variables con óxido crómico pueden estar relacionadas con problemas analíticos generados por la presencia del fósforo y otros minerales en muestras de digesta (**Selle. 2007**).

I.9.3.2. Factores de alimentación:

En la categoría de los factores de alimentación, la concentración y la fuente del fitato, la calidad de las proteínas, y las concentraciones de cationes divalentes, vitamina D y quelantes minerales en la dieta, pueden afectar la respuesta de la proteína y los aminoácidos a la fitasa microbiana. Se ha encontrado que en dietas bajas en fósforo, la

digestibilidad de los aminoácidos aumentaba por la adición de fitasa (**Ravindran et al. 2000**). Hay consenso en que el calcio tiene un efecto negativo sobre la eficacia de la fitasa debido a la formación del complejo fitato-Ca que deja al sustrato menos accesible a la actividad de la fitasa (**Selle. 2006**).

Se acepta que los complejos de Ca-fitato se forman principalmente en el intestino delgado donde tienen una influencia negativa considerable sobre la eficacia de la fitasa de la mucosa. Sin embargo, las fitasas exógenas son activas principalmente en segmentos más proximales del intestino, donde los niveles de pH son más bajos y, por tanto su eficacia no debería estar influenciada por los complejos de Ca-fitato en el intestino delgado. Sin embargo, hay datos que indiquen que se producen las interacciones de calcio y fitato también en condiciones ácidas con la formación de especies de Ca-fitato soluble e insoluble, lo que podría afectar negativamente a la eficacia de fitasa exógena (**Selle. 2009**).

I.9.3.3. Las cuestiones relativas a los protocolos experimentales:

Las respuestas a la adición de fitasa también pueden depender del procesamiento de la dieta y del punto y el método de toma de muestras (especialmente en los cerdos con respecto a la canulación ileal o métodos de sacrificio) (**Adeola. 2003**).

I.9.3.4. Factores de animales:

La genética y el sexo, la edad de los animales son factores que probablemente repercuten en la respuesta, en relación con el tiempo de tránsito gastrointestinal y pH, así como la regulación de la actividad fitasa por la luz intestinal. Hasta que varios de estos factores se cuantifiquen adecuadamente, la información esencial relativa a cuándo y cuánto respuesta que se puede esperar será difícil de alcanzar (**Adeola. 2003**).

I.9.4. Utilización de la energía:

La posibilidad de que la fitasa afecte positivamente la utilización de la energía en las aves de corral tiene implicaciones prácticas considerables. Como se ha descrito anteriormente, el fitato tiene un efecto negativo sobre la utilización de la energía. La adición de fitasa ha producido una mejora de la utilización de la energía en muchos estudios, sobre todo en los pollos de engorde (**Selle. 2007**).

Ravindran et al. (2000) observaron que la adición de una fitasa (400 U / kg de dieta) aumentó el valor de la energía metabolizable aparente (EMA) un 5,34% en las dietas bajas en PNP (0,23%) y una 4% en dietas con valor normal del PNP (0,45%).

Se sugiere que el efecto positivo de la fitasa sobre la utilización de la energía está relacionado con el aumento de digestibilidad de la grasa, la proteína y almidón (**Selle. 2007**).

I.9.4.1. Fitasa y energía derivada de la grasa, proteína y almidón:

Hay una evidencia de la interacción entre el fitato y los lípidos en el maíz y se ha sugerido que estas lipofitinas son complejos de Mg/Ca-fitato, lípidos y péptidos. Por lo tanto, parece posible que el complejo fitato-Ca y lípidos puede estar involucrado en la formación de jabones metálicos en el intestino de las aves, que son los principales limitantes sobre la utilización de la energía derivada de lípidos. Se ha encontrado que el sebo bovino reduce la utilización del fósforo fítico en pollos jóvenes y aumenta el porcentaje de grasa excretada como ácidos grasos de jabón. Se ha descrito que la adición de fitasa puede hidrolizar parcialmente el fitato en la parte proximal del intestino de los pollos, y por tanto puede prevenir la formación del complejo Ca-fitato y lípidos y dejar a la grasa más disponible con lo que aumenta la digestibilidad de la misma en el intestino por la adición de fitasa. La mejora de la digestibilidad de los aminoácidos también conduciría a aumentar la utilización de la energía (**Selle. 2007**).

Se ha sugerido que el fitato puede unirse al almidón directamente o indirectamente a través la proteína asociada con el almidón, pero hay pocos ensayos in vitro que apoyen la existencia de este complejo fitato-almidón. Sin embargo, el fitato es un factor inhibidor de la enzima α -amilasa, y este efecto se ha corroborado por varios estudios, según la revisión de **Selle et al. (2000)**. **Martin et al. (1998)** encontraron que la adición de fitasa redujo la actividad del alfa-amilasa en el intestino delgado de los patos, pero no está claro que la inhibición de la actividad de amilasa por el fitato en el tracto gastrointestinal limite la digestión del almidón.

Parece que la inhibición de la actividad de la amilasa por el fitato puede impedir la digestión del almidón, cual sería contrarrestado con la fitasa, pero es posible que este efecto sea marginal (**Selle. 2007**).

I.9.5. Disponibilidad del fosforo y el calcio:

La suplementación de fitasa ha demostrado producir una mejora en la digestibilidad del fósforo en aves, reduciéndose el fósforo no fítico en las dietas de aves en 0,10 a 0,20 puntos porcentuales sin ningún efecto significativo en el rendimiento (**Woyengo. 2011**).

Las mejoras en la disponibilidad del fósforo que resulta con la adición de fitasa, generalmente, se sitúan en el rango de 20 a 40%. La cantidad de fósforo liberado por la fitasa microbiana depende de la concentración y la fuente de la fitasa añadida, del nivel de fósforo fítico y calcio de la dieta y del contenido de vitamina D3 (**Singh. P.K. 2008**). **Ahmad et al. (2000)** observaron que la adición de fitasa a una dieta baja en fósforo aumentó la retención de este último en un 20,4% y 12,73% en comparación con el control negativo (dieta baja en P) y el control positivo (dieta con P normal) suplementadas con fitasa, respectivamente. **Ravindran et al. (2000)** observaron que la suplementación de una fitasa (800 U / kg) aumentó la digestibilidad del P en 40,3, 58,9 y 44,1% en dietas con contenido bajo (0,29%), medio (0,37%) y alto (0,44%) en PP, basadas en trigo, sorgo y harina de soja. La mejora en la disponibilidad del fósforo permite una reducción de éste en la dieta.

Esencialmente, las fitasas exógenas aumentan la absorción del calcio en el intestino delgado por la hidrólisis parcial del fitato a ésteres inferiores en los segmentos más proximales del intestino. Los ésteres inferiores tienen una capacidad reducida para quelar el calcio, por lo tanto, disminuye la formación del complejo Ca-fitato tan insoluble y aumenta la disponibilidad del calcio (**Selle. P.H. 2009**).

El porcentaje de cenizas del hueso es un parámetro sensible y fiable para la determinación de la utilización de fósforo fítico y se considera más preciso que la ganancia de peso. Los estudios de meta análisis de **Narcy et al. (2009)** mostraron un efecto positivo de la adición de fitasa (500 U / kg) sobre las cenizas de las tibias en función de los niveles de PNP.

I.9.6. Disponibilidad de otros minerales:

El ácido fítico tiene una gran capacidad quelante para formar una variedad de complejos con diferentes caciones (Ca, Zn, Mg, Mn, Cu, Fe), convirtiéndolos en biológicamente no disponibles. Varios estudios han demostrado un efecto positivo de la fitasa sobre la disponibilidad de los minerales por la hidrólisis del fitato. Se ha descrito que el zinc es el mineral que tiene la unión más fuerte con el fitato frente a los otros minerales (**Singh. P.K. 2008**). **Mohanna y Nys (1999)** demostraron que la adición de fitasa microbiana (800 U / kg en una dieta a base de maíz y harina de soja) aumentó la disponibilidad de zinc y posibilitó una reducción del zinc a 14 mg / kg en dietas de pollos de engorde. En otros ensayos, se ha descrito que la adición de fitasa sola no tiene efecto sobre la

retención del zinc en pollos, pero esta retención mejora con la adición de vitamina D3 (**Singh. P.K. 2008**). **Viveros et al. (2002)** mostraron que la suplementación de una fitasa a dietas deficientes en fósforo mejora la utilización de P, Ca, Mg y Zn en pollos de engorde.

Hay varios estudios que han demostrado el efecto positivo de la fitasa sobre la retención del hierro (Fe) en pollos. **Paik et al. (2000)** han encontrado que la disminución de los niveles del fósforo no fítico en dietas de pollos aumenta el nivel de hierro en el plasma, y que la adición de la fitasa microbiana aumentó más el nivel plasmático de Fe. **Um et al. (2000)** mostraron que la adición de fitasa a una dieta deficiente en fósforo no fítico a base de maíz y harina de soja mejora la utilización del hierro en pollos de engorde. Por el contrario, en el ensayo de **Biehl et al (1997)** no se encontró ningún efecto positivo sobre la biodisponibilidad de hierro en dietas a base de harina de soja.

En lo que se refiere al cobre (Cu) hay varios estudios que muestran que la adición de fitasa mejora la retención del Cu (**Um et al. 2000, Lan et al. 2002**), en contra al estudio de **Biehl et al (1997)**, en el que los autores observaron que la adición de la fitasa no tuvo ningún efecto positivo sobre la retención de Cu.

II- Objetivos:

En el proyecto actual se han estudiado los efectos de la adición de fitasa microbiana a dos diferentes tipos de dieta produce en su valor nutricional, en los rendimientos productivos de las aves, así como en la reducción del impacto ambiental del fósforo excretado.

Evaluar el efecto de la dosis no-convencional de la fitasa microbiana sobre la digestibilidad del fósforo, y en un intento de ver algún efecto adverso de la tolerancia de esta enzima.

Confirmar el papel de la fitasa endógena presente en determinadas materias primas en los procesos de absorción y metabolismo mineral y en la productividad de las aves, así como el efecto diferenciado de la fitasa microbiana en dietas ricas en polisacáridos no amiláceos NSP.

III-Material y métodos:

Se realizaron dos experimentos, ambos con el mismo diseño experimental pero distintos en el cereal de base de las dietas. En el primer ensayo se utilizó centeno y en el segundo se empleó trigo. Los procedimientos experimentales fueron iguales por lo que se describen conjuntamente.

III.1. Métodos analíticos:

Los métodos utilizados para evaluar la composición de las dietas, contenidos intestinales, excretas y huesos procedentes de los ensayos se describen a continuación:

- ❖ Materia seca, por desecación de las muestras en una estufa durante 4 horas a 103°C (método AOAC n° 925.09, 2000).
- ❖ Proteína bruta (N x 6,25) mediante método Dumas, con el analizador de nitrógeno Leco FP-528 (Leco, St. Joseph, MI) (método AOAC n° 968.06, 2000).
- ❖ Fósforo total, por colorimetría mediante reacción con vanadomolibdato amónico (método AOAC n° 965.17, 2000).
- ❖ Calcio, por espectrometría de absorción atómica tras calcinación de las muestras a 550°C durante 5 horas (método AOAC n° 968.08, 2000).
- ❖ Titanio, mediante método descrito por **Short et al. (1996)**.
- ❖ Actividad fitasa, mediante método de **Engelen (1994)**. Este método colorimétrico se basa en la determinación del fósforo inorgánico, liberado en la hidrólisis del fitato sódico a pH 5,5. Una unidad fitasa se define como la cantidad de enzima que libera 1 micromol por minuto de fosforo inorgánico de ácido fitico a pH 5.5 y 37°C.
- ❖ Fibra bruta, mediante analizador de fibra Ankom basado en la tecnología de bolsas de filtración.
- ❖ Extracto etéreo, mediante extracción en continuo con sistema automático Buchi B-811 (método AOAC n° 920.39, 2000).
- ❖ Cenizas, mediante calcinación en horno mufla a 550°C hasta peso constante (método AOAC n° 942.05, 2000).
- ❖ Energía bruta, mediante calorímetro adiabático IKA C-2000 (Norma DIN 51900).

Viscosidad intestinal. Las muestras de contenido intestinal se centrifugaron a 10000 rpm durante 5 minutos a 15°C, y la viscosidad se midió en el sobrenadante

- ❖ mediante un viscosímetro Brookfield a 30°C. Los dos experimentos se llevaron a cabo en la finca experimental del Centro IRTA de Mas Bover, Ctra.. Reus a El Morell, km. 3,8, 43120 Constantí (España).

III.2. Animales experimentales:

Se utilizaron en cada ensayo, doscientos ochenta y ocho pollos machos de la estirpe Ross 308. Los pollitos se asignaron a 48 jaulas (réplicas) ubicadas en dos baterías Petersime, con nido con calentamiento eléctrico. Cada réplica consistió en 6 animales. La superficie de cada jaula es de 0.376 m², de modo que la densidad de población es de 16 aves/m². Las baterías se encuentran en una habitación provista de ventilación forzada. Se aplicó el programa de la iluminación estándar de la granja, y fue de 23 horas en los 4 primeros días, 20 horas de 4 a 10 días, posteriormente 18 horas hasta el final del ensayo. La temperatura se ajustó entre 30-35°C en la primera semana de la prueba y disminuyó 2 grados cada semana. El pienso y el agua se proporcionaron a los animales *ad libitum*. La duración de los dos ensayos fue de 21 días.

La limpieza profiláctica, la desinfección y la vacunación se llevó a cabo de acuerdo con la práctica habitual. Las aves se vacunaron contra la bronquitis infecciosa en la incubadora.

III.3. Dietas basales:

Se utilizó un solo tipo de dieta en cada ensayo durante todo el experimento. Los alimentos experimentales se mezclaron en la fábrica de piensos perteneciente al departamento de Nutrición Monogástricos del IRTA de Mas Bover. Todos los ingredientes, excepto la grasa, sal, fosfato bicálcico, carbonato cálcico, el corrector vitamínico-mineral y el enzima, se molieron con un molino de martillos de 40 HP hasta un tamaño de partícula de 3 mm. La mezcladora tiene una capacidad de 500 l y el tiempo de mezcla fue de 6 minutos. Los aminoácidos, el corrector vitamínico-mineral y el enzima se mezclaron previamente con una alícuota de 1º kg de harina de soja 48%, en una mezcladora pequeña, y luego añadidos a la mezcladora de 500 l.

Los cálculos de los nutrientes y la composición de las dietas basales se muestran en la Tabla 4. Las materias primas principales utilizadas en los dos ensayos fueron; centeno (Ensayo 1) y trigo (Ensayo 2), harina de soja 48% y soja extrusionada. También se incluyó 0,5% de óxido de titanio en las dietas de los dos ensayos como marcador de digestibilidad.

Tabla 4: Composición de las dietas basales.

Ingrediente	(%)			
	Dieta a base de centeno		Dieta a base de trigo	
	P normal	P bajo	P normal	P bajo
Centeno	55.470	58.138	-	-
Trigo	-	-	60.613	63.610
Harina de soja 48%	18.970	20.979	27.327	29.722
Soja extrusionada	17.844	14.518	4.137	0.088
Manteca de cerdo	4.000	4.000	4.000	4.000
DL-metionina	0.273	0.274	0.242	0.242
L-lisina HCl	0.054	0.063	0.130	0.144
Carbonato-cálcico	1.028	0.721	1.015	0.709
Fosfato dicálcico	1.629	0.572	1.702	0.650
Sal	0.319	0.321	0.434	0.436
Cloruro de colina 50%	0.008	0.015	-	-
Minerales y vitaminas ¹	0.400	0.400	0.400	0.400
Composición calculada				
Energía metabolizable (Kcal/kg)	3000	3000	3000	3000
Proteína bruta (%)	21.50	21.50	21.50	21.50
Fibra bruta (%)	2.82	2.84	2.80	2.81
Grasa bruta (%)	8.68	8.05	6.42	5.77
Cenizas (%)	5.71	4.35	5.79	4.42
Lisina (%)	1.20	1.20	1.20	1.20
Met + Cys (%)	0.92	0.92	0.92	0.92
Calcio (%)	0.90	0.54	0.90	0.54
Fósforo total (%)	0.65	0.48	0.68	0.50
Fósforo inorgánico (%)	0.45	0.27	0.45	0.27
Fitasa endógena	-	-	353.13	370.68

¹Corrector vitaminico-mineral: Vitamina A, 12000 IU; Vitamina D3, 2400 IU; Vitamina E, 30 mg; Vitamina K3, 3 mg; Vitamina B1, 2.2 mg, Vitamina B2, 8.0 mg; Vitamina B6, 5.0 mg; Vitamina B12, 11.0 µg; Acidofólico, 1.5 mg; Biotina, 150 µg; Pantotenato de calcio, 25 mg; Acido nicotínico, 65 mg; Etoxiquina, 150 mg; (para centeno: **Fe, 40 mg; Zn, 20 mg**, para trigo: **Fe, 80 mg; Zn, 40 mg**) Cu, 8 mg ;Mn, 60 mg, Se, 0.15 mg, I, 0.33 mg.

Cabe mencionar que la cantidad utilizada del Fe y Zn de la dieta a base de centeno fue la mitad que en el caso del trigo, para comprobar si las cantidades más bajas ya cumplían con los requerimientos, y por tanto no hacía falta a ofrecer valores superiores.

III.4. Tratamientos experimentales:

En ambos ensayos, se evaluaron ocho tratamientos experimentales replicados seis veces y asignados por bloques al azar, de acuerdo con la ubicación de las jaulas en la sala experimental. Cada réplica contenía seis animales. Como se muestra en la Tabla 5 se utilizaron cuatro tipos de dietas diferentes, según el tipo de cereal utilizado (tratado o no tratado) y con dos niveles de fósforo inorgánico (0.45% o 0.27%) y con la adición o no de dos niveles de fitasa microbiana (500 y 5000 U/kg) a las dietas bajas en fósforo. Se utilizó una fitasa recubierta fue adicionada en forma de polvo. El centeno y el trigo se trataron por calor (en autoclave a 120 °C) durante 15 min para desactivar la fitasa endógena, analizando posteriormente el cereal para comprobar la actividad remanente. Los piensos de los dos ensayos no contenían coccidiostáticos, o cualquier antibiótico promotor de crecimiento, ni otros probióticos/ prebióticos, aditivos para piensos o cualquier enzima diferente de los contemplados en la evaluación. Las dietas fueron ofrecidas en forma de harina en los dos ensayos.

Tabla 5: Tratamientos experimentales.

Tratamiento	Cereal	P inorgánico	Fitasa añadida (U/g)
T-1	No tratado	0.45 %	-
T-2	No tratado	0.27 %	-
T-3	No tratado	0.27 %	500
T-4	No tratado	0.27 %	5000
T-5	Autoclavado	0.45 %	-
T-6	Autoclavado	0.27 %	-
T-7	Autoclavado	0.27 %	500
T-8	Autoclavado	0.27 %	5000

III.5. Preparación de muestras:

Previo a su análisis, las materias primas y piensos se molieron en un molino de ciclón de laboratorio Retsch ZM-1, hasta obtener un tamaño de partícula de 0,5 mm. Los contenidos ileales y las excretas se congelaron a -20°C y se liofilizaron, y se prepararon en una picadora.

III.6. Parámetros productivos:

Los piensos y los pollitos se pesaron al inicio y al final de los dos ensayos, y se calcularon el consumo de alimento, la ganancia media diaria de peso y el índice de conversión. Diariamente, se registró la mortalidad y las posibles causas de la misma.

III.7. Actividad fitasa:

De cada dieta se tomaron muestras para comprobar la actividad fitasa. La determinación de la actividad fitasa (Tabla 3) se hizo mediante el método de **Englen (1994)**. Este método colorimétrico se basa en la determinación del fósforo inorgánico, liberado en la hidrólisis del fitato sódico a pH 5,5. Una unidad fitasa se define como la cantidad de enzima que libera 1 micromol por minuto de fosforo inorgánico de ácido fitico a pH 5.5 a 37°C.

III.8. Viscosidad intestinal:

Para medir la viscosidad intestinal, se tomaron muestras de digesta desde el divertículo de Meckel hasta 15 cm antes de la conjunción íleo-cecal de 2 pollitos en cada jaula que se mantuvieron en baño de agua con hielo, hasta el momento de la centrifugación. Las muestras de digesta se centrifugaron a 12000 rpm durante 5 minutos, a 15°C; el sobrenadante se recogió y almacenó en frío hasta el momento de la medición. La viscosidad se determinó usando un viscometro cono-placa digital de Brookfield manteniéndolo a 30°C.

III.9. Composición mineral del plasma:

Para el análisis de los minerales del plasma se extrajeron muestras de sangre de dos pollos en cada jaula por punción cardiaca. Las muestras se centrifugaron a 2000 rpm durante 10 minutos, después se separó el plasma y se congeló para el análisis de calcio, fósforo, zinc y hierro.

III.10. Cenizas de los dedos y las tibias:

De acuerdo con el procedimiento numero 3884 aprobado por la Comisión de Ética en Experimentación Animal del IRTA, se sacrificaron 3 pollos de cada jaula, y posteriormente, se cortaron sus dedos centrales de y luego se calcinaron para obtener valores de las cenizas. Al mismo tiempo, se cortaron las piernas izquierdas de estos pollos y se congelaron. En el momento del análisis, las patas se descongelaron y pasaron por autoclave, para facilitar la eliminación de los tejidos blandos y la separación de las

tibias que se calcinaron para obtener valores de las cenizas. Las cenizas se analizaron mediante el método AOAC (1990) n° 942.05, descrito anteriormente

III.11. Balance proteico, energético y mineral:

III.11.1. Energía metabolizable retención fecal aparente de minerales:

La determinación de la digestibilidad fecal aparente del fósforo y el calcio se midió en ensayo de balance, usando el óxido de titanio como marcador. Desde el primer día los pollos se alimentaron con las dietas experimentales, a los 21 días de edad se recogieron las excretas de cada jaula cuatro horas después la limpieza de la bandejas. Las excretas se congelaron a -20°C para evitar la degradación microbiana o la pérdida de NH₃. Posteriormente las excretas se agruparon por cada jaula, se liofilizaron y equilibrados a la humedad atmosférica durante 24 horas. Luego se molieron y se guardaron en bolsas de plástico antes el análisis. En las muestras de excretas se midieron el óxido de titanio mediante el método descrito por **Short et al. (1996)**, el fósforo por colorimetría mediante reacción con vanadomolibdato amónico (método AOAC n° 965.17, 2000) y el calcio por espectrometría de absorción atómica tras calcinación de las muestras a 550°C durante 5 horas (método AOAC n° 968.08, 2000).

La digestibilidad aparente fecal del fósforo y el calcio se calculó mediante la ecuación:

$$\% \text{ Digestibilidad} = (1 - [(Ti_{\text{pienso}}/Ti_{\text{excreta}}) \times (\text{Nutriente}_{\text{excreta}}/\text{Nutriente}_{\text{pienso}})]) \times 100$$

Dónde: Ti_{pienso} = concentración marcador en el pienso. Ti_{excreta} = concentración marcador en la excretas. $\text{Nutriente}_{\text{excreta}}$: concentración del P o Ca en excretas. $\text{Nutriente}_{\text{pienso}}$: concentración del P o Ca en pienso.

La energía metabolizable corregida por nitrógeno se evaluó asumiendo que la ganancia del peso se compone de 200g de proteína/ kg de la ganancia, esa proteína es igual a 6.25 x Kjeldhal nitrógeno, y la energía es equivalente a 8.22 Kcal/kg de nitrógeno retenido. El coeficiente de la digestibilidad aparente fecal de los nutrientes se calculó como la diferencia entre la concentración de los nutrientes ingeridos y excretados dividido por la concentración de los nutrientes ingeridos.

III.11.2. Digestibilidad ileal de proteína:

A 22-23 días de edad, todas las aves se sacrificaron por inyección intravenosa de pentobarbital sódico (de acuerdo con el procedimiento número. 3884 aprobado por la Comisión de Ética de IRTA) para recoger muestras ileales. Se tomaron muestras de digesta en los últimos 15 cm ante la conjunción íleo-cecal se agruparon por jaula y se congelaron. Posteriormente, se liofilizaron y analizaron los contenidos de proteína bruta y de óxido de titanio, utilizado como marcador, mediante método descrito por **Short et al. (1996)**.

La digestibilidad ileal aparente de la proteína se calculó mediante la ecuación:

$$\% \text{ Digestibilidad} = (1 - [(Ti_{\text{pienso}}/Ti_{\text{digesta}}) \times (PB_{\text{digesta}}/PB_{\text{pienso}})]) \times 100$$

Dónde: Ti_{pienso} = concentración marcador en el pienso; Ti_{digesta} = concentración marcador en la digesta, PB_{pienso} = concentración proteína en el pienso; PB_{digesta} = concentración proteína en la digesta

III.12. Análisis estadística:

Se han aplicado procedimientos de análisis de la varianza (ANOVA) por tratamientos (8 tratamientos) y mediante diseños factoriales parciales (2 x 3:6 tratamientos: dosis fitasa x tratamiento cereal). Los tratamientos T-2, T-3, T-4, T6, T-7, T-8 fueron analizados de forma factorial para determinar los efectos principales de la fitasa y el tipo del cereal y las posibles interacciones entre ellos

Los datos fueron analizados mediante el procedimiento GLM (SAS, 2002) en un diseño de bloques al azar. La significación estadística se aceptó cuando $P < 0.05$. Todas las medias de los tratamientos se compararon mediante la prueba de rangos múltiples de Duncan. Los efectos principales de la adición de fitasa microbiana y del tratamiento del cereal fueron también, analizados por los siguientes grupos de contrastes:

Nivel P: 0.45% vs 0.27% (T1+T5 vs T2+T6).

No tratado vs Autoclavado (T1 a T4 vs T5 a T8)

Sin fitasa vs Fitasa (T2+T6 vs T3+4+T7+T8).

Dosis: 500 ppm vs 5000 ppm (T3+T7 vs T4+T8).

IV-Resultados:

Los estudios previos demostraron que las condiciones empleadas en la autoclave fueron efectivas para inactivar la enzima fitasa endógena de los dos cereales. En estos estudios sólo se evaluó principalmente la actividad fitásica, es decir, el resto de parámetros que se pueden ver afectados por el proceso térmico de la autoclave no se evaluaron, en los cereales directamente, pero si en los piensos. En la (Tabla 6) se puede observar los resultados obtenidos de la actividad fitasa en las dietas usadas en los dos ensayos. Se puede ver en las dietas control positivo a base de centeno no tratado la actividad fitasa es más alta que la del control negativo, aunque estas diferencias son esperables dada la precisión del método analítico. En las dietas a base de trigo no tratado en los dos controles (CP y CN) presentaron valores casi idénticos, la diferencia se corresponde al valor teórico obtenido en la formulación. El proceso de autoclave se ha visto eficaz en reducir la fitasa endógena a valores residuales. Los valores de las dietas con fitasa microbiana exógena, demuestran que hay un aumento gradual tal como se pretendía. Además que la actividad fitasica en las dietas a base de centeno son más altas de las a base de trigo.

Los análisis proximales de las dietas experimentales en cuanto los parámetros nutritivos presentaron valores similares de las dietas a base de centeno y dietas a base de trigo, excepto para la energía bruta y la proteína bruta. Los análisis de fósforo total y calcio, corroboran los valores deseados en la formulación de las dietas.

Tabla 6: la actividad fitasa encontrada en las dietas experimentales.

Tratamiento	cereal	P inorgánico	Fitasa añadida (U/g)	Fitasa analizada (U/g)	
				centeno	trigo
T-1	No tratado	0.45 %	-	1027	345
T-2	No tratado	0.27 %	-	951	357
T-3	No tratado	0.27 %	500	1535	814
T-4	No tratado	0.27 %	5000	6096	4836
T-5	Autoclavado	0.45 %	-	49	103
T-6	Autoclavado	0.27 %	-	79	0
T-7	Autoclavado	0.27 %	500	700	418
T-8	Autoclavado	0.27 %	5000	5345	4636

Tabla 7: análisis proximales de las dietas experimentales.

Centeno								
Muestras	Humidad (%)	Cenizas (%)	Proteína bruta (%)	Energía bruta (Kcal/kg)	Fósforo total (%)	Calcio (%)	Hierro (%)	Zinc (%)
040098 T-1	10.48	6.27	23.85	4284	0.62	0.95	222	60
040099 T-2	10.63	4.97	23.85	4301	0.37	0.57	182	61
040100 T-3	10.56	5.13	23.74	4308	0.38	0.55	186	57
040101 T-4	10.51	5.19	23.69	4301	0.39	0.48	179	54
040102 T-5	10.62	5.96	20.92	4258	0.60	0.84	182	53
040103 T-6	10.95	4.89	20.81	4272	0.41	0.59	174	63
040104 T-7	11.01	4.87	20.80	4281	0.40	0.60	179	60
040105 T-8	10.81	4.95	20.77	4282	0.39	0.52	182	52
Trigo								
030033 T-1	9.78	5.94	22.15	4197	0.62	0.91	175	62.1
030034 T-2	9.82	5.05	21.73	4180	0.39	0.65	195.2	59
030035 T-3	9.86	4.96	21.39	4187	0.44	0.58	154.5	59.1
030036 T-4	9.79	5.02	22.04	4201	0.44	0.55	187.3	55.5
030037 T-5	10.33	6.20	21.73	4160	0.65	0.98	169.4	74
030038 T-6	11.46	4.93	20.30	4111	0.44	0.58	186.2	63.5
030039 T-7	11.55	4.74	20.14	4142	0.45	0.55	166.4	57.5
030040 T-8	11.47	4.69	20.22	4144	0.44	0.50	171.7	61

IV.1. Parámetros productivos y viscosidad intestinal:

a- Experimento 1:

A los 21 días de edad hubo diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los tratamientos en cuanto el peso vivo, la ganancia media diaria, el consumo medio diario, el índice de conversión y la viscosidad intestinal (Tabla 8). Los animales alimentados con T8 presentaron mejor peso vivo, ganancia media diaria, consumo medio diario y viscosidad intestinal pero peor índice de conversión (1.488g/g). Los animales alimentados con las dietas control positivo a base de centeno no tratado presentaron mejor índice de conversión (1.369g/g) que los demás.

Tabla 8: parámetros productivos y viscosidad intestinal de 1 a 21 días en dietas a base de centeno (análisis jerárquico)

Tratamiento	Centeno	P inorgánico	Fitasa añadida (U/kg)	Peso final (g)	GMD (g/d)	CMD (g/d)	IC(g/g)	viscosidad intestinal (cps)
T-1	No tratado	0.45 %	-	579.9b	25.4b	35.6bc	1.396c	20.22bc
T-2	No tratado	0.27 %	-	568.0b	24.3b	34.4c	1.463b	24.97ab
T-3	No tratado	0.27 %	500	561.8b	24.6b	34.4c	1.433abc	29.95a
T-4	No tratado	0.27 %	5000	605.4b	26.6b	36.5bc	1.401bc	20.3bc
T-5	Autoclavado	0.45 %	-	564.0b	24.7b	36.9bc	1.497a	13.92cd
T-6	Autoclavado	0,27%	-	559.0b	24,4b	35.9bc	1,467a	17.37cd
T-7	Autoclavado	0.27 %	500	602.4b	26.5b	39.0b	1.468a	12.56d
T-8	Autoclavado	0.27 %	5000	669.4a	29.7a	42.8a	1.488a	12.95d
Err.Es				15.68	0.77	1.18	0.021	2.21
P-valor				0.0006	0.0004	0.0003	0.0073	0.0001
Contrastes (P-valor)								
Nivel P: 0.45% vs 0.27% (T1+T5 vs T2+T6)				0.6012	0.3702	0.3763	0.3679	0.0664
No tratado v Autoclavado (T1 a T4 vs T5 a T8)				0.0905	0.0556	0.0003	0.0005	0.0001
Sin fitasa vs. Fitasa (T2+T6 vs T3+4+T7+T8)				0.0025	0.0007	0.0075	0.3330	0.1062
Dosis: 500 ppm vs 5000 ppm (T3+T7 vs T4+T8)				0.0018	0.0023	0.0211	0.7693	0.2648

a, b, c d: las medias dentro de una columna con diferentes superíndices son significativamente diferentes ($P < 0.05$). **GMD:** Ganancia Media Diaria, **CMD:** Consumo Medio Diario, **IC:** Índice de Conversión.

En contrastes lineales, en cuanto el tipo del cereal (no tratado vs autoclavado) no hay diferencias significativas entre tratamientos en el peso final y la ganancia media diaria, mientras que hay diferencias muy significativas entre tratamientos en cuanto al consumo medio diario ($p < 0.0003$), índice de conversión ($p < 0.0005$) y la viscosidad

intestinal ($p < 0.0001$). Sin embargo, en el análisis factorial (Tabla 9), el tratamiento por calor del centeno mejoró los parámetros productivos y la viscosidad intestinal, salvo el índice de conversión donde presento el peor valor. También en los contrastes lineales, se encontraron diferencias significativas en cuanto a la presencia de enzima fitasa microbiano exógeno, con pesos superiores en presencia de la enzima, así como también se encontraron por el efecto de la dosis. De igual forma, se encontraron la misma tendencia en cuanto a la ganancia media diaria, y el consumo medio diario teniendo en cuenta que estos valores son el cociente del peso final entre los días de duración del ensayo y el cociente del consumo total entre los días del ensayo, respectivamente. Con estos valores se obtienen los valores del índice de conversión. El valor más bajo (mejor índice de conversión), corresponde a las dietas control positivo con centeno no tratado (1.369 g/g), mientras que los índices de conversión de todas las dietas de centeno autoclavado presentaron peores valores.

Tabla 9: Parámetros productivos y viscosidad intestinal de 1 a 21 días en dietas a base de centeno (análisis factorial)

Tratamiento	Centeno	P inorgánico	Fitasa añadida (U/g)	Peso final (g)	GMD (g/d)	CMD (g/d)	IC(g/g)	viscosidad intestinal (cps)
T-2	No tratado	0.27	-	568.0	24.3	34.4	1.463	24.97
T-3	No tratado	0.27	500	561.8	24.6	34.4	1.433	26.95
T-4	No tratado	0.27	5000	605.4	26.6	36.6	1.401	20.30
T-6	Autoclavado	0.27	-	559.0	24.4	35.9	1.467	17.37
T-7	Autoclavado	0.27	500	602.4	26.5	39.0	1.468	12.56
T-8	Autoclavado	0.27	5000	669.4	29.7	42.8	1.488	12.95
Fitasa, U/kg			0	563.13b	24.41b	35.26b	1.465	21.17a
			500	583.98b	25.67b	36.95b	1.452	20.41ab
			5000	634.49a	28.08a	40.00a	1.444	16.29b
			P-valor	0.0002	0.0001	0.0029	0.6265	0.1297
			DE	11.22	0.56	0.85	0.016	1.58
Centeno			No tratado	580.09b	25.25b	35.17b	1.432b	24.29a
			Autoclavado	606.84a	26.76a	39.27a	1.475a	14.39b
			P-valor	0.0204	0.0112	0.0003	0.0282	0.0001
			DE	9.30	0.45	0.73	0.013	1.27
Interacción Fitasa*Centeno			P-valor	0.0814	0.1813	0.1471	0.1739	0.1181

a, b: las medias dentro de una columna con diferentes superíndices son significativamente diferentes ($P < 0.05$). **GMD**: Ganancia Media Diaria, **CMD**: Consumo Medio Diario, **IC**: Índice de Conversión.

Los contrastes lineales confirman estos resultados, donde la adición de la fitasa microbiana teniendo en cuenta a sus niveles produjeron mejoras significativas en los parámetros productivos ($p < 0.05$), salvo el índice de conversión.

Así mismo, se confirman estos resultados en los análisis factoriales, (Tabla 9) salvo que en este caso, el efecto del tratamiento del centeno (autoclave) produjo diferencias significativas en todos los parámetros productivos.

La viscosidad intestinal se vio afectada significativamente ($P < 0.05$) por los tratamientos experimentales. Los contrastes lineales muestran que el proceso de autoclave del centeno, fue el único factor determinante ($P < 0.0001$). Estos resultados se confirman mediante los análisis factoriales (Tabla 9), donde se observó una reducción de la viscosidad intestinal cuando los animales ingirieron las dietas con centeno Autoclavado (14,39 vs 24,29). La creciente adición de fitasa produjo una ligera disminución de la viscosidad, que no llegó a ser significativa estadísticamente.

b- Experimento 2:

Los animales alimentados con dietas controles positivos son los que tuvieron un peso vivo más elevado, con mejor ganancia media diaria, respecto a los otros animales (Tabla 10). Todos los animales alimentados con dietas deficientes en fosforo mostraron un crecimiento menor de los anteriores, aunque similares entre ellos, excepto en el caso de los animales que ingirieron dietas control negativo y sin fitasa, que todavía tuvieron un peso más bajo. En los contrastes lineales, se encontraron diferencias significativas en cuanto a la presencia de enzima fitasa microbiano exógeno ($P < 0.002$), con pesos superiores en presencia de la enzima, así como también se encontraron por el efecto de la autoclave. ($P < 0.01$). Proporcionalmente, se encontraron los mismos resultados en cuanto a la ganancia media diaria.

No se encontraron diferencias significativas del consumo medio diario entre tratamientos, a pesar de que la presencia de la fitasa pareció aumentar la ingesta según el estudio del contraste lineal de las dietas con presencia de fitasa microbiana a las que no tienen ($P < 0.05$). Contrariamente, no se observaron diferencias de consumo entre los tratamientos en los Análisis factoriales (Tabla 11).

Tabla 10: parámetros productivos y viscosidad intestinal de 1 a 21 días en dietas a base de trigo (análisis jerárquico).

Tratamiento	Trigo	P inorgánico	Fitasa añadida (U/kg)	Peso final (g)	GMD (g/d)	CMD (g/d)	IC (g/g)	Viscosidad intestinal (cps)
T-1	No tratado	0.45 %	-	790.6a	35.5a	48.46	1.353d	3.37
T-2	No tratado	0.27 %	-	716.5b	32.0b	46.88	1.464c	2.62
T-3	No tratado	0.27 %	500	742.8b	33.2b	47.61	1.431c	2.70
T-4	No tratado	0.27 %	5000	749.5b	33.6b	47.89	1.438c	2.69
T-5	Autoclavado	0.45 %	-	794.4a	35.7a	49.46	1.390d	3.41
T-6	Autoclavado	0,27%	-	667.8c	29.7c	45.74	1.537a	3.27
T-7	Autoclavado	0.27 %	500	708.9b	31.6b	48.45	1.532ab	3.21
T-8	Autoclavado	0.27 %	5000	729.1b	32.6b	48.62	1.500b	2.60
Err.Es				13,6	0.64	0.81	0.012	0.28
P-valor				<0.0001	<0.0001	0.1624	<0.001	0.0971
Contrastes (P-valor)								
Nivel P: 0.45% vs 0.27% (T1+T5 vs T2+T6)				0.0052	0.001	0.0001	0.001	0.0770
No tratado vs Autoclavado (T1 a T4 vs T5 a T8)				0.0139	0.019	0.6696	0.001	0.1224
Sin fitasa vs. Fitasa (T2+T6 vs T3+4+T7+T8)				0.0024	0.004	0.0153	0.027	0.5057
Dosis: 500 ppm vs 5000 ppm (T3+T7 vs T4+T8)				0.3302	0.324	0.7170	0.325	0.2213

a, b, c d: las medias dentro de una columna con diferentes superíndices son significativamente diferentes ($P < 0.05$). **GMD**: Ganancia Media Diaria, **CMD**: Consumo Medio Diario, **IC**: Índice de Conversión.

El mejor índice de conversión se obtuvo con dietas control positivo con trigo no tratado (1.353 g/g), mientras que los peores valores fueron con las dietas deficientes en fósforo con trigo pasado por autoclave, ya sea con o sin enzima exógena. En los contrastes, se confirmaron estos resultados, por un lado, la adición de fitasa microbiana produjo mejoras significativas en todos los parámetros ($P < 0.05$), originados con independencia del nivel de fitasa incorporado a la dieta, pues no se observaron diferencias entre la presencia de 500 o 5000 U/ Kg de fitasa. Por otra parte, los mejores resultados en los parámetros productivos excepto el consumo medio diario se obtuvieron con el trigo sin tratar ($P < 0.001$). Los valores de viscosidad intestinal medidos fueron bajos, y no se observaron diferencias significativas en los valores de la viscosidad intestinal entre los tratamientos individuales. Sin embargo, en el análisis factorial de los datos (Tabla 11), sin incluir los controles positivos, se obtuvo que el proceso de autoclave del trigo afectó la viscosidad intestinal ($P < 0,05$), presentando una viscosidad más elevada los tratamientos con trigo autoclavado.

Tabla 11: Parámetros productivos y viscosidad intestinal de 1 a 21 días en dietas a base de trigo (análisis factorial).

Tratamiento	Trigo	P inorgánico	Fitasa añadida (U/g)	Peso final (g)	GMD (g/d)	CMD (g/d)	IC(g/g)	Viscosidad intestinal (cps)
T-2	No tratado	0.27	-	716.5	32.0	46.9	1.464	2.62
T-3	No tratado	0.27	500	742.8	33.3	47.6	1.431	2.70
T-4	No tratado	0.27	5000	749.6	33.6	47.9	1.438	2.69
T-6	Autoclavado	0.27	-	667.8	29.7	46.4	1.537	3.27
T-7	Autoclavado	0.27	500	709.0	31.7	48.5	1.532	3.22
T-8	Autoclavado	0.27	5000	729.2	32.6	48.6	1.500	2.66
Fitasa, U/kg			0	691.0b	30.8b	46.6	1.500a	2.95
			500	725.9ab	32.5ab	48.0	1.482ab	2.96
			5000	739.4a	33.1a	48.3	1.466b	2.64
			P-valor	0.0121	0.0122	0.2394	0.0413	0.239
			DE	11.3	0.5	0.7	0.01	0.15
Trigo			No tratado	736.3a	33.0a	47.4	1.444b	2.67b
			Autoclavado	701.2b	31.3b	47.9	1.522a	3.02a
			P-valor	0.0075	0.0076	0.5704	0.0001	0.0464
			DE	8.9	0.4	0.6	0.007	0.12
Interacción Fitasa*Trigo			P-valor	0.601	0.602	0.718	0.277	0.174

a, b: las medias dentro de una columna con diferentes superíndices son significativamente diferentes ($P < 0.05$). **GMD**: Ganancia Media Diaria, **CMD**: Consumo Medio Diario, **IC**: Índice de Conversión.

Como comparación entre los dos ensayos, se ve que los animales alimentados con dietas a base de trigo presentaron valores mayores en cuanto al peso vivo, ganancia media diaria y consumo medio diario frente los animales alimentados con dietas a base de centeno. Las dietas controles positivos presentaron mejor índices de conversión en los dos ensayos. Los animales alimentados con centeno tratado no tuvieron diferencias en el peso final y la ganancia media diaria, que es el contrario en el caso del trigo. En cuanto al índice de conversión, el tratamiento de los cereales en general empeoró los resultados. En los dos ensayos, la adición de la fitasa mejoró los diferentes parámetros productivos, salvo que en el caso del trigo, donde no afectó el consumo medio diario. En cuanto el nivel de la fitasa (evaluado por el contraste lineal 500 vs 5000 U/kg), los animales alimentados con dietas a base de centeno, y un nivel de fitasa de 5000 U/Kg, presentaron diferencias significativas en el peso final, la ganancia media diaria y el consumo medio diario. Sin embargo no se observó un efecto dosis de fitasa, en los parámetros productivos de los animales alimentados con las dietas a base de trigo.

Los animales del ensayo 1 (centeno) presentaron una viscosidad intestinal mucho más alta que los animales del ensayo 2 (trigo). El efecto de la autoclave fue positivo en el ensayo 1 donde se redujo la viscosidad intestinal frente el ensayo 2 donde se observó el efecto contrario, mientras que la fitasa no tuvo efectos en ninguno de los dos ensayos.

IV.2. Valores energéticos y digestibilidad ileal aparente de la proteína:

a- Experimento 1:

En la Tabla 12 se muestran los valores de la EMA y EMAn. Los valores son muy similares, y no se ve diferencias significativas entre tratamientos. En contrastes lineales el tratamiento del centeno mediante autoclave mejoró el valor energético de las dietas ($p < 0.05$) respecto al no tratado, excepto el control positivo (T1), en que los valores fueron iguales. La adición de la fitasa, teniendo en cuenta sus niveles, no afectó los valores de energía e independientemente de que el cereal sea tratado o no tratado. Los resultados de EMAn siguieron la misma pauta, y por tanto, y el tratamiento del centeno mejoró la energía de las dietas, mientras que la fitasa no tuvo ningún efecto. Estos valores se confirmaron en los análisis factoriales (Tabla 13). El proceso de autoclave incrementó alrededor de un 2% el valor energético. Merece mención resaltar que, a pesar que las dietas se formularon para contener 3000 Kcal/kg de EMAn, los valores realmente determinados oscilaron entre 2694 y 2801, inferiores por tanto a los valores esperados. Esto puede ser debido a la concentración de polisacáridos no amiláceos en las dietas procedentes del centeno (2,21% de β -glucanos y 5,46% de arabinoxilanos), que resultan factores antinutritivos.

No hubo diferencias significativas en la digestibilidad de la proteína entre los tratamientos, ya sea el centeno tratado o no, con o sin fitasa exógena teniendo en cuenta sus niveles. De igual modo, no se observaron diferencias significativas en la evaluación estadística por contrastes lineales y mediante los análisis factoriales

Tabla 12: Valores energéticos de las dietas experimentales a base de centeno, y digestibilidad ileal aparente de la proteína (análisis jerárquico).

Tratamiento	Centeno	P inorgánica	Fitasa añadida (U/g)	EMA (Kcal/kg)	EMAn (Kcal/kg)	Digestibilidad ileal de proteína (%)
T-1	No tratado	0.45 %	-	2940	2751	77.60
T-2	No tratado	0.27 %	-	2872	2694	78.07
T-3	No tratado	0.27 %	500	2864	2680	77.35
T-4	No tratado	0.27 %	5000	2876	2693	79.00
T-5	Autoclavado	0.45 %	-	2976	2801	76.35
T-6	Autoclavado	0.27 %	-	2913	2734	77.03
T-7	Autoclavado	0.27 %	500	2973	2793	78.47
T-8	Autoclavado	0.27 %	5000	2921	2756	76.68
Err.Es.				39.9	45.3	1.00
<i>P-valor</i>				0.2871	0.3532	0.5748

Contraste (P-valor)

Nivel P: 0.45% vs 0.27% (T1+T5 vs T2+T6)	0.0960	0.1315	0.5782
No tratado vs. Autoclavado (T1 a T4 vs T5 a T8)	0.0411	0.0329	0.2336
Sin fitasa vs. Fitasa (T2+T6 vs T3+4+T7+T8)	0.6319	0.6599	0.7135
Dosis: 500 ppm vs 5000 ppm (T3+T7 vs T4+T8)	0.6136	0.7907	0.9294

EMA: energía metabolizable aparente. **EMAn:** energía metabolizable aparente corregida por nitrógeno.

Tabla 13: valores energéticos de las dietas experimentales a base de centeno, y digestibilidad ileal aparente de la proteína (análisis factorial).

Tratamiento	Centeno	P inorgánico	Fitasa añadida (U/g)	EMA (Kcal/kg)	EMAn (Kcal/kg)	Digestibilidad ileal de proteína (%)
T-2	No tratado	0.27	-	2872	2694	78.07
T-3	No tratado	0.27	500	2864	2680	77.35
T-4	No tratado	0.27	5000	2876	2693	79.00
T-6	Autoclavado	0.27	-	2913	2734	77.03
T-7	Autoclavado	0.27	500	2973	2793	78.47
T-8	Autoclavado	0.27	5000	2921	2756	76.68
Fitasa, U/kg			0	2895	2718	77.55
			500	2914	2743	77.91
			5000	2899	2724	77.84
			P-valor	0.7115	0.8283	0.9215
			DE	24.2	27.3	0.66
Centeno			No tratado	2871 b	2689 b	78.14
			Autoclavado	2934 a	2759 a	77.39
			P-valor	0.0237	0.0254	0.3388
			DE	19.2	22.3	0.54
Interacción Fitasa*Centeno			P-valor	0.5315	0.5918	0.1828

a, b: las medias dentro de una columna con diferentes superíndices son significativamente diferentes ($P < 0.05$). **EMA:** energía metabolizable aparente. **EMAn:** energía metabolizable aparente corregida por nitrógeno.

b- Experimento 2:

En la Tabla 14 se muestran los valores de la EMA y EMAn. Los mejores valores se corresponden con las dietas con 5000 U/ kg de fitasa exógena, tanto con trigo no tratado como con trigo autoclavado (3672 y 3663 Kcal/kg, respectivamente), mientras que los valores más bajos corresponden a las dietas de trigo no tratado y niveles deficientes en fósforo, sin o con 500 U/kg de fitasa (3579 y 3571 Kcal/kg, respectivamente) ($P<0.04$). Una situación similar, se encontró con la EMAn, coincidiendo que el valor más alto obtuvo con T4 y T8 (3484 y 3491 Kcal/kg, respectivamente), y el valor más bajo es del T3 (3387 Kcal/kg) ($P<0,02$). En la evaluación de los contrastes lineales, se obtuvieron resultados significativos los estudios referentes al tratamiento de trigo sobre la EMAn ($P<0.02$) (con valores energéticos más elevados cuando el trigo se pasó por autoclave) y la inclusión de 500 o 5000 U/kg de fitasa microbiana en ambos parámetros es decir la EMA y la EMAn (con valores más elevados con 5000 U/kg de fitasa) ($P<0,005$). Estos resultados se confirmaron en los análisis factoriales (Tabla 15), excepto que el tratamiento del trigo no afectó los valores de la EMA.

Tabla 14: Valores energéticos de las dietas experimentales a base de trigo, y digestibilidad ileal aparente de la proteína (análisis jerárquico).

Tratamiento	Trigo	P inorgánico	Fitasa añadida (U/g)	EMA (Kcal/kg)	EMAn (Kcal/kg)	Digestibilidad ileal de proteína (%)
T-1	No tratado	0.45 %	-	3624 ab	3431 abc	82,54 b
T-2	No tratado	0.27 %	-	3579 b	3399 bc	81,95 b
T-3	No tratado	0.27 %	500	3571 b	3387 c	82,03 b
T-4	No tratado	0.27 %	5000	3672 a	3484 a	84,59 a
T-5	Autoclavado	0.45 %	-	3618 ab	3428 abc	82,98 ab
T-6	Autoclavado	0.27 %	-	3623 ab	3452 abc	82,71 b
T-7	Autoclavado	0.27 %	500	3632 ab	3460 ab	82,55 b
T-8	Autoclavado	0.27 %	5000	3663 a	3491 a	83,7 ab
Err.Es				22,27	21,57	0,54
P-valor				0.0299	0.0137	0.0315
Contrastes (P-valor)						
Nivel P: 0.45% vs 0.27% (T1+T5 vs T2+T6)				0.3910	0.8585	0.4456
No tratado vs. Autoclavado (T1 a T4 vs T5 a T8)				0.0901	0.0179	0.7776
Sin fitasa vs. Fitasa (T2+T6 vs T3+4+T7+T8)				0.1010	0.1316	0.0809
Dosis: 500 ppm vs 5000 ppm (T3+T7 vs T4+T8)				0.0049	0.0054	0.0027

a, b, c: las medias dentro de una columna con diferentes superíndices son significativamente diferentes ($P < 0.05$). **EMA**: energía metabolizable aparente. **EMAn**: energía metabolizable aparente corregida por nitrógeno.

En la evaluación factorial de los valores de energía metabolizable, se observó que la fitasa incorporada a 5000 U/kg aumentó significativamente el valor energético de la dieta, tanto de EMA ($P<0.003$), como EMAn ($P<0.004$).

Trigo con valores de EMAn superiores al esperado 3400 vs 3000. Trigo de buena calidad, sustrato difícil para ver efecto enzimas.

Las dietas con niveles bajos en fosforo, y con 5000 U/kg de fitasa, son las que produjeron mejor digestibilidad ileal de la proteína (84.6% y 83,7%, con trigo no tratado o autoclavado, respectivamente). En los análisis de contrastes, no se obtuvieron diferencias significativas en la digestibilidad ileal de la proteína, ni por el tratamiento del trigo ni por la adición de fitasa microbiana, mientras que la inclusión de 5000 U / kg de fitasa produjo un aumento en la digestibilidad ileal de proteínas respecto a la inclusión de 500 unidades.

Tabla 15: Valores energéticos de las dietas experimentales a base de trigo, y digestibilidad ileal aparente de la proteína (análisis factorial).

Tratamiento	trigo	P inorgánico	Fitasa añadida (U/g)	EMA (Kcal/kg)	EMAn (Kcal/kg)	Digestibilidad ileal de proteína (%)
T-2	No tratado	0.27	-	3579	3400	81,85
T-3	No tratado	0.27	500	3571	3388	82,03
T-4	No tratado	0.27	5000	3672	3484	84,59
T-6	Autoclavado	0.27	-	3623	3452	82,71
T-7	Autoclavado	0.27	500	3632	3461	82,55
T-8	Autoclavado	0.27	5000	3664	3491	83,7
Fitasa, U/kg			0	3602b	3426b	82.29 b
			500	3602b	3424b	82.27 b
			5000	3668a	3488a	84.19 a
			P-valor	0,003	0,004	0.0057
			DE	16	15	0.43
Trigo			No tratado	3608	3424b	82.86
			Autoclavado	3640	3468a	82.99
			P-valor	0,079	0,015	0.7954
			DE	13	12	0.36
Interacción Fitasa*Trigo			P-valor	0,256	0,275	0.3585

a, b: las medias dentro de una columna con diferentes superíndices son significativamente diferentes ($P < 0.05$). **EMA**: energía metabolizable aparente. **EMAn**: energía metabolizable aparente corregida por nitrógeno.

Comparando los dos ensayos, el tratamiento del centeno con autoclave mejoró los valores de los dos parámetros (es decir la EMA y la EMAn), sin embargo en el caso del trigo mejoró sólo la EMAn. En el caso de la adición de la fitasa microbiana incluso la dosis, no tuvo efectos sobre los dos parámetros en las dietas a base de centeno ya sea tratado o no tratado, pero en dietas a base de trigo las dosis más alta de fitasa

microbiana han mejorado los valores de la EMA y la EMAn ya sea el trigo tratado o no tratado.

La digestibilidad ileal de la proteína, no se ha afectado en las dietas a base de centeno, ya sea tratado o no, con o sin fitasa microbiana, mientras que en las dietas a base de trigo la inclusión de 5000 U / kg de fitasa produjo un aumento en la digestibilidad ileal de proteínas respecto a la inclusión de 500 unidades, que se observa tanto en el contraste lineal, como en el análisis factorial (84,2% vs 82, %, $P < 0.006$).

IV.3. Composición mineral del plasma y la composición de los dedos:

a- Experimento 1:

Los datos de la composición mineral del plasma de los animales utilizados en el ensayo se exponen en la Tabla 16. En el caso de la medida del fósforo no fitico, se observa que los animales alimentados con dietas control negativo presentaron menores concentraciones en la sangre, que los animales alimentados con dietas control negativo y con 5000 U/kg de fitasa microbiana (6.26 y 5.47 mg/dl por T2 y T6 frente 8.45 y 8.68 mg/dl para T4 y T8, respectivamente). La adición de la fitasa microbiana aumentó significativamente su concentración ($p < 0.001$). En los contrastes lineales, la adición de la fitasa incrementó significativamente la concentración del fósforo no fitico en la sangre ($P < 0.001$), mientras que el tratamiento del centeno por autoclave disminuyó su concentración ($p < 0.01$); estos efectos se confirmaron en los análisis factoriales, donde también hubo una interacción significativa ($p < 0.05$) entre el centeno y la fitasa microbiana (Tabla 17).

Se observa que los animales alimentados con dietas control positivo (T1. T5), presentaron mayor concentración del calcio en la sangre de los demás. La disminución de la concentración del fósforo total en las dietas experimentales, disminuyó significativamente la concentración del calcio en la sangre ($p < 0.01$). En los contrastes lineales no se ve efecto sobre la retención del calcio en dietas a base de centeno tratado o no tratado, con o sin fitasa ni el efecto de la dosis. Al contrario, en los análisis factoriales, el tratamiento del centeno mejoro la concentración del calcio en la sangre, mientras que la fitasa no tuvo efecto.

No se observaron diferencias estadísticas en las concentraciones del hierro y el zinc en la sangre, pero hubo una interacción significativa ($p < 0.05$) entre el centeno y la fitasa en las concentraciones del hierro (Tabla 17)

Los valores más altos de las cenizas en los dedos de los pollos, se obtuvieron en los animales que comieron dietas controles positivos T1 y T5 (12.06% y 12.19%, respectivamente). El valor más bajo se obtuvo con los animales alimentados con dietas bajas en fósforo y con centeno autoclavado (10.24%). En los contrastes lineales, se encontraron diferencias significativas ($p < 0.01$) en el contenido de cenizas, debido a la presencia de la fitasa microbiana exógena, con valores más altos que los controles negativos, así como se encontraron por el efecto de la dosis. El tratamiento del centeno afectó significativamente el valor de cenizas ($p < 0.007$) con concentraciones más bajas frente el centeno no tratado. Los análisis factoriales (Tabla 17), confirmaron los resultados obtenidos por el efecto de la adición de la fitasa microbiana ($P < 0.0001$), y el efecto del tratamiento del centeno sobre las concentraciones de las cenizas en los dedos ($P < 0.004$), así como una interacción significativa ($p < 0.01$) entre ambos factores.

b- Experimento 2:

Los datos de la composición mineral del plasma sanguíneo de los animales utilizados en el ensayo se encuentran en la Tabla 18. En el caso de la medida de la concentración del fósforo no fitico, se observa que los animales que comieron las dietas control negativo tuvieron una menor concentración en la sangre que los animales que comieron las dietas control negativo más 5000 U /Kg de fitasa (6.6 y 6.4 mg / dl para T-2 y T-5 frente 8.2 y 7.9 mg / dl para T-4 y T-8, respectivamente) ($P < 0.003$). Referente a los contrastes lineales sólo se produjeron diferencias significativas en el fosforo no fitico, debido a la presencia de enzima exógeno y al nivel de la enzima (aumentando su concentración con la adición de enzima), mientras que el tratamiento del trigo no produjo ningún efecto sobre este parámetro. Este hecho se corrobora en el estudio factorial (Tabla 19), observándose que, la adición gradual de fitasa a las dietas deficientes de fosforo aumentó significativamente el nivel de este elemento en sangre, proporcionalmente a la dosis de fitasa en las dietas ($P < 0.0008$), mientras que el tratamiento con autoclave del centeno no tuvo ningún efecto.

Los animales que ingirieron las dietas control positivo con trigo tratado por autoclave dieron mejor concentración del calcio en la plasma. La disminución del nivel de fósforo

total de la dieta produjo una ligera disminución de la concentración plasmática de calcio de los animales, ya sea con o sin fitasa.

Dado que solo se observaron efectos significativos sobre el calcio del plasma debido al nivel de fosforo, en el estudio factorial no se obtuvieron efectos del nivel de fitasa adicionado o del tratamiento del trigo en el nivel plasmático de calcio (Tabla 19).

En cuanto a la concentración del zinc en el plasma, no se encontraron efectos significativos por los tratamientos individuales (Tabla 18), Sin embargo, tanto en la evaluación de los contrastes lineales como en el análisis factorial, se vio un efecto de la dosis de la fitasa exógena, en el sentido que la dosis de 5000 U/kg disminuye la concentración del zinc en el plasma frente a la dosis de 500 U/kg. Mientras que el hierro no se ha afectado ni por el tipo del cereal no por la fitasa exógena.

El valor más alto del porcentaje de las cenizas de los dedos de los pollos se obtuvo con la dieta control positivo con trigo no tratado (12.65%), mientras que los que ingirieron dieta control negativo con trigo autoclavado presentaron porcentaje más bajo (10.72%). El resto de los tratamientos no dieron diferencias entre ellos, con valores intermedios.

El efecto del tratamiento del trigo no dio diferencias significativas, pero sí que se obtuvieron al evaluar la adición de la fitasa microbiana donde las mayores concentraciones se obtuvieron después de añadir 5000 U/kg de fitasa en el pienso, tanto en la evaluación por contraste lineal ($p < 0.01$), como en el análisis factorial ($P < 0.03$).

Comparando entre los dos ensayos. La concentración del fósforo en el plasma fue casi igual en los dos ensayos ya sea los animales ingirieron cereal tratado o no tratado, sin o con fitasa microbiana. El tratamiento del cereal afectó los valores del fósforo en el ensayo 1(disminuyendo la concentración del fósforo en el plasma), y observando el efecto contrario en el ensayo 2. Por otra parte, la adición creciente de la fitasa microbiana aumentó la concentración del fósforo en la sangre, ya sea con el cereal tratado o no tratado.

Tabla 16: Composición mineral de la plasma, y composición de los dedos y tibias del ensayo 1 (análisis jerárquico).

Tratamiento	Centeno	P inorgánico	Fitasa añadida (U/g)	Ca (mg/dl)	P (mg/dl)	Fe (mg/dl)	Zn (mg/dl)	Humedad dedos (%)	Cenizas de dedos (%)
T-1	No tratado	0.45 %	-	12.52 a	8.17 ab	123.0	138.2	66.74	12.06 a
T-2	No tratado	0.27 %	-	11.73 b	6.26 d	123.7	136.8	66.97	11.05 cd
T-3	No tratado	0.27 %	500	11.81 b	7.82 bc	112.7	132.3	65.90	11.46 bc
T-4	No tratado	0.27 %	5000	11.93 ab	8.45 ab	128.2	136.8	66.82	11.77 ab
T-5	Autoclavado	0.45 %	-	12.50 a	7.79 bc	108.0	126.8	66.07	12.19 a
T-6	Autoclavado	0.27 %	-	11.99 ab	5.47 e	125.1	152.2	67.50	10.24 e
T-7	Autoclavado	0.27 %	500	12.15 ab	7.25 c	128.1	141.8	65.79	10.99 d
T-8	Autoclavado	0.27 %	5000	12.33 ab	8.68 a	110.4	150.2	66.10	11.78 ab
Err.Es.				0.21	0.23	7.0	8.7	0.52	0.14
P-valor				0.0208	0.0001	0.1240	0.2166	0.2397	0.0001
Contraste (P-valor)									
Nivel P: 0.45% vs 0.27% (T1+T5 vs T2+T6)				0.0011	0.0001	0.1840	0.1300	0.1169	0.0001
No tratado vs. Autoclavado (T1 a T4 vs T5 a T8)				0.0708	0.0148	0.3796	0.2169	0.5224	0.0072
Sin fitasa vs. Fitasa (T2+T6 vs T3+4+T7+T8)				0.2319	0.0001	0.4131	0.5256	0.0204	0.0001
Dosis: 500 ppm vs 5000 ppm (T3+T7 vs T4+T8)				0.4200	0.0001	0.8596	0.3852	0.2449	0.0005

a, b, c, d, e: las medias dentro de una columna con diferentes superíndices son significativamente diferentes ($P < 0.05$).

Tabla 17: Composición mineral de la plasma, y composición de los dedos y tibias del ensayo 1 (análisis factorial).

Tratamiento	Centeno	P inorgánico	Fitasa añadida (U/g)	Ca (mg/dl)	P (mg/dl)	Fe (mg/dl)	Zn (mg/dl)	Humedad de dedos (%)	Cenizas de dedos (%)
T-2	No tratado	0.27	-	11.73	6.26	124	137	66.97	11.05
T-3	No tratado	0.27	500	11.81	7.82	113	132	65.90	11.46
T-4	No tratado	0.27	5000	11.93	8.45	128	137	66.82	11.77
T-6	Autoclavado	0.27	-	11.99	5.47	125	152	67.50	10.24
T-7	Autoclavado	0.27	500	12.15	7.25	128	142	65.79	10.99
T-8	Autoclavado	0.27	5000	12.33	8.68	110	150	66.10	11.78
Fitasa, U/kg			0	11.9	5.8 c	124	146	67.24 a	10.65 c
			500	12.0	7.5 b	120	137	65.84 b	11.22 b
			5000	12.1	8.6 a	119	144	66.46 ab	11.77 a
			P-valor	0.3462	0.0001	0.7046	0.6000	0.0286	0.0001
			DE	0.13	0.15	4.56	5.82	0.35	0.09
Centeno			No tratado	11.8 b	7.5 a	121	135 b	66.56	11.42 a
			Autoclavado	12.2 a	7.1 b	121	148 a	66.47	11.00 b
			P-valor	0.0282	0.0316	0.9513	0.0557	0.8265	0.0004
			DE	0.11	0.12	3.6	4.7	0.28	0.08
Interacción Fitasa*Centeno			P-valor	0.9320	0.0479	0.0320	0.9317	0.4512	0.0140

a, b, c,:las medias dentro de una columna con diferentes superíndices son significativamente diferentes ($P < 0.05$).

Tabla 18: Composición mineral de la plasma, y composición de los dedos del ensayo 2 (análisis jerárquico).

Tratamiento	Trigo	P inorgánico	Fitasa añadida (U/g)	Ca (mg/dl)	P (mg/dl)	Fe (ug/dl)	Zn (ug/dl)	Materia seca de dedos (%)	Cenizas de dedos (%)
T-1	No tratado	0.45 %	-	11,3 ab	7,8 ab	115,5	161,8 ab	33,76 ab	12,65 a
T-2	No tratado	0.27 %	-	11,3 ab	6,6 c	118	159,3 ab	32,97 b	11,25 bc
T-3	No tratado	0.27 %	500	10,9 b	7,4 abc	104,3	165,7 ab	33,66 ab	11,86 ab
T-4	No tratado	0.27 %	5000	11,0 b	8,2 a	128,3	144 ab	34,38 a	11,93 ab
T-5	Autoclavado	0.45 %	-	11,7 a	7,3 abc	116,2	162,8 ab	34,28 a	12,11 ab
T-6	Autoclavado	0.27 %	-	10,9 b	6,4 c	114,3	155,8 ab	33,3 ab	10,72 c
T-7	Autoclavado	0.27 %	500	11,1 b	6,9 bc	109,7	169,1 a	33,76 ab	11,44 bc
T-8	Autoclavado	0.27 %	5000	11,0 b	7,9 ab	112,7	136,8 b	33,34 ab	11,73 b
Err.Es.				0,2	0,3	7,4	9,9	2702	0,31
P-valor				0,035	0,003	0,521	0,24	0,105	0,002
Contraste (P-valor)									
Nivel P: 0.45% vs 0.27% (T1+T5 vs T2+T6)				0.0516	0.0046	0.9644	0.6211	0.0212	<.0001
No tratado vs. Autoclavado (T1 a T4 vs T5 a T8)				0.6735	0.2715	0.4417	0.7570	0.5102	0.1443
Sin fitasa vs. Fitasa (T2+T6 vs T3+4+T7+T8)				0.6694	0.0008	0.7085	0.6570	0.0523	0.0091
Dosis: 500 ppm vs 5000 ppm (T3+T7 vs T4+T8)				0.8912	0.0104	0.0716	0.0063	0.6926	0.5736

a, b, c: las medias dentro de una columna con diferentes superíndices son significativamente diferentes ($P < 0.05$).

Tabla 19: Composición mineral de la plasma, y composición de los dedos y tibias del ensayo 2 (análisis factorial).

Tratamiento	Trigo	P inorgánico	Fitasa añadida (U/g)	Ca (mg/dl)	P (mg/dl)	Fe (mg/dl)	Zn (mg/dl)	Materia seca de dedos (%)	Cenizas de dedos (%)	
T-2	No tratado	0.27	-	11,3	6,6	118	159,3	32,97	11,25	
T-3	No tratado	0.27	500	10,9	7,4	104,3	165,7	33,66	11,86	
T-4	No tratado	0.27	5000	11	8,2	130,4	147,2	34,38	11,93	
T-6	Autoclavado	0.27	-	10,9	6,4	114,3	155,8	33,3	10,72	
T-7	Autoclavado	0.27	500	11,1	6,9	109,7	169,1	33,76	11,44	
T-8	Autoclavado	0.27	5000	11	7,9	112,7	136,8	33,34	11,73	
Fitasa, U/kg				0	11,1	6,5 b	116,2	157,6 b	33,13	11,01 b
				500	11	7,1 b	107,2	167,5 a	33,71	11,63 b
				5000	11	8,0 a	120,7	141,6 b	33,87	11,84 a
				P-valor	0,88	0,0008	0,088	0,05	0,169	0,0309
				DE	0,1	0,3	4,6	7,8	0,28	0,22
Trigo			No tratado	11,1	7,3	116,8	158	33,67	11,67	
			Autoclavado	11	7,0	112,1	154,7	33,48	11,31	
			P-valor	0,639	0,338	0,552	0,74	0,553	0,151	
			DE	0,1	0,2	3,7	6,3	0,23	0,18	
Interacción Fitasa*Trigo			P-valor	0,301	0,909	0,325	0,861	0,222	0,819	

a, b: las medias dentro de una columna con diferentes superíndices son significativamente diferentes ($P < 0.05$).

En cuanto al calcio, sus valores plasmáticos fueron más altos en los pollos que ingirieron dietas a base de centeno que en los animales que ingirieron dietas a base de trigo; el tratamiento del trigo no afectó los valores del calcio, pero en el caso del centeno sí que aumentó la concentración de este mineral en la sangre.

Las concentraciones del zinc fueron ligeramente más bajas en la sangre de los pollos alimentados con dietas a base de centeno frente a los pollos que ingirieron dietas a base de trigo, y en este último, la adición de dosis altas en fitasa microbiana disminuyó su concentración.

En referencia al hierro no se ve diferencias de sus concentraciones en la sangre de los pollos en los dos ensayos, ya sea el cereal tratado o no tratado, con o sin fitasa exógena.

No se observan diferencias en la concentración de las cenizas de los dedos comparando los dos ensayos. Además, en ambos casos se dieron las concentraciones más altas en las dietas control positivo. La adición creciente de la fitasa exógena aumentó las concentraciones de las cenizas de los dedos, ya fuera el cereal, trigo o centeno. Sin embargo, el tratamiento de este último en autoclave disminuyó las concentraciones de las cenizas pero no las afectó en el caso del trigo.

IV.4. Excreción de los minerales y retención aparente del fósforo total y del calcio en las dietas experimentales:

a- Experimento 1:

La cantidad de minerales en las excretas y la retención aparente del fósforo total y el calcio se muestran en la Tabla 20. El porcentaje de fósforo total en la excreta muestra claramente un cierto paralelismo con la reducción de fósforo total producida en la formulación de los piensos. La cantidad es más alta en las dietas control positivo (0.65% por T-1 y 0.64% por T-5), y en el resto de las seis dietas la cantidad se mantiene entre 0.1 y 0.2%, pero ni por la adición de fitasa microbiana ni por el tratamiento del centeno se encontraron diferencias significativas, así pues no se encontraron diferencias en la excreción del fósforo excepto en el caso del T-8 donde el centeno tratado por autoclave y con 5000 U/kg de fitasa microbiano dio cantidad más baja respecto al control negativo con centeno tratado. En el caso de la retención del fósforo total, la cantidad fue más baja en las dietas control positivo (62.97% por T-1 y 64.07% por T-5). Mientras en el resto de los seis tratamientos se mejoró la retención del fósforo, pero ni

por la adición de fitasa ni por tratamiento del centeno se encontraron diferencias significativas. En los análisis factoriales (Tabla 21) se confirmaron estos resultados, donde la fitasa y el tratamiento del centeno no tuvieron efectos sobre la excreción y la retención del fósforo total.

El nivel del calcio en las excretas está relacionada directamente con su inclusión en las dietas, como ocurre en el caso del fósforo. Las excretas correspondientes a los animales que ingirieron los controles positivos con centeno sin tratar (1.40% Ca) y con centeno pasado por autoclave (1.36% Ca) se encontró que eran los que tenían más calcio, mientras que las excretas correspondientes a los animales que ingirieron las otras dietas presentaron valores más bajos, aproximadamente del 40%. En los contrastes lineales hubo diferencias significativas por la adición de la fitasa microbiana ($p < 0.05$), disminuyendo el porcentaje del calcio en las excretas, sin tener cuenta al tipo del centeno (tratado o no tratado) y a la dosis de la fitasa. En donde en los análisis factoriales (Tabla 21), se ve claramente el efecto de la fitasa microbiana. Pero, en cuanto a la retención aparente del calcio los resultados fueron justo al contrario en las concentraciones del mineral en las excreta, ya que las retenciones de las dietas con controles positivos (48.92 % por T-1 y 45.59 % por T -5) dieron valores más bajos que las retenciones de las otras dietas. En el estudio de los contrastes, y los análisis factoriales, ni la adición de fitasa microbiana ni el tratamiento del centeno ni el nivel de fitasa dieron resultados estadísticamente significativos.

También se evaluaron las concentraciones del hierro y el zinc en las excretas. Las excretas correspondientes a los animales que comieron los controles positivos con centeno sin tratar (134 ppm) y con centeno pasado por autoclave (140 ppm), se encontró que eran los que tenían más zinc, mientras que las excretas correspondientes a los animales que comieron las otras dietas presentaron valores más bajos. En el estudio de los contrastes, y los análisis factoriales, ni la adición de fitasa microbiana ni el tratamiento del centeno ni el nivel de fitasa dieron resultados estadísticamente significativos. La reducción de la cantidad del fósforo fitico en las dietas muestra una cierta tendencia a aumentar la retención del zinc. Los animales alimentados con dieta control positivo con centeno pasado por autoclave mostraron valores más bajos (9.37 %). En los contrastes lineales no se obtuvieron diferencias significativas en cuanto al tratamiento del centeno, pero sí que se con la adición de la fitasa exógena incluso el efecto de la dosis, donde disminuyeron la retención del zinc.

Tabla 20: excreción de los minerales y retención aparente del fosforo total y del calcio en las dietas experimentales a base de centeno (análisis jerárquico).

Tratamiento	Centeno	P inorgánico	Fitasa añadida (U/g)	P total en excretas (%/MS)	P total retenido (%)	Ca en excretas (%/MS)	Ca retenido (%)	Zn en excretas (ppm)	Zn retenido (%)	Fe en excretas (ppm)	Fe retenido (%)
T-1	No tratado	0.45 %	-	0.65 a	62.97 b	1.40 a	48.92 c	134 ab	21.81 abc	178 c	73.85 a
T-2	No tratado	0.27 %	-	0.22 bc	78.32 a	0.57 b	63.22 ab	123 b	27.87 a	191 bc	60.84 b
T-3	No tratado	0.27 %	500	0.18 bc	83.00 a	0.50 b	66.24 ab	124 b	19.53 bc	217 abc	56.65 b
T-4	No tratado	0.27 %	5000	0.19 bc	82.33 a	0.51 b	61.94 b	125 b	16.26 cd	215 abc	56.12 b
T-5	Autoclavado	0.45 %	-	0.64 a	64.07 b	1.36 a	45.59 c	140 a	9.37 d	226 abc	57.64 b
T-6	Autoclavado	0.27 %	-	0.27 b	77.33 a	0.61 b	64.01ab	129 b	28.24 a	202 bc	59.14 b
T-7	Autoclavado	0.27 %	500	0.24 bc	79.57 a	0.53 b	69.95 a	128 b	26.56 ab	240 ab	53.21 b
T-8	Autoclavado	0.27 %	5000	0.16 c	84.73 a	0.47 b	68.50 ab	126 b	14.41 cd	256 a	54.37 b
Err.Es.				0.03	2.69	0.07	2.37	3.9	2.93	16.3	3.03
P-valor				0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0731	0.0001	0.0190	0.0007
Contraste (P-valor)											
Nivel P: 0.45% vs 0.27% (T1+T5 vs T2+T6)				0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0074	0.0001	0.7144	0.0466
No tratado vs. Autoclavado (T1 a T4 vs T5 a T8)				0.4796	0.9686	0.9818	0.1991	0.1113	0.2320	0.0076	0.0076
Sin fitasa vs. Fitasa (T2+T6 vs T3+4+T7+T8)				0.0628	0.0603	0.0484	0.1120	0.8923	0.0009	0.0123	0.0588
Dosis: 500 ppm vs 5000 ppm (T3+T7 vs T4+T8)				0.3160	0.3685	0.5005	0.1816	0.8609	0.0040	0.6708	0.9220

a, b, c, d: las medias dentro de una columna con diferentes superíndices son significativamente diferentes ($P < 0.05$).

Tabla 21: excreción de los minerales y retención aparente del fosforo total y del calcio en las dietas experimentales a base de centeno (análisis factorial).

Tratamiento	Centeno	P inorgánico	Fitasa añadida (U/g)	P total en excretas (%/MS)	P total retenido (%)	Ca en excretas (%/MS)	Ca retenido (%)	Zn en excretas (ppm)	Zn retenido (%)	Fe en excretas (ppm)	Fe retenido (%)
T-2	No tratado	0.27	-	0.22	78.32	0.57	63.22	123	27.87	191	60.84
T-3	No tratado	0.27	500	0.18	83.00	0.50	66.24	124	19.53	217	56.65
T-4	No tratado	0.27	5000	0.19	82.33	0.51	61.94	125	16.26	215	56.12
T-6	Autoclavado	0.27	-	0.27	77.33	0.61	64.01	129	28.24	202	59.14
T-7	Autoclavado	0.27	500	0.24	79.57	0.53	69.95	128	26.56	240	53.21
T-8	Autoclavado	0.27	5000	0.16	84.73	0.47	68.50	126	14.41	256	54.37
Fitasa, U/kg			0	0.24	77.78	0.59 a	63.65 b	126	28.09 a	197 b	59.91
			500	0.20	81.28	0.52 b	68.10 a	126	23.36 a	228 ab	55.09
			5000	0.18	83.53	0.48 b	65.22 ab	125	15.34 b	238 a	55.25
			P-valor	0.1698	0.1882	0.0142	0.0381	0.9747	0.0003	0.0589	0.1974
			DE	0.02	2.24	0.03	1.23	2.7	1.9	11.7	2.2
Centeno			No tratado	0.19	81.39	0.52	63.83 b	124	20.45	209	57.79
			Autoclavado	0.22	80.54	0.53	67.49 a	128	23.07	233	55.80
			P-valor	0.4003	0.8794	0.8035	0.0115	0.2424	0.4763	0.0749	0.3839
			DE	0.02	1.80	0.02	1.00	2.2	1.6	9.7	1.8
Interacción Fitasa*Centeno			P-valor	0.3929	0.6223	0.4362	0.2481	0.7707	0.3074	0.6602	0.9515

a, b: las medias dentro de una columna con diferentes superíndices son significativamente diferentes ($P < 0.05$).

En cuanto la concentración del hierro en las excretas hubo diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0.05$). Donde los animales alimentados con dietas control positivo (T-1), dieron concentración más baja (178 ppm), mientras que los animales que ingirieron dietas a base de centeno tratado y con 5000 U/kg de fitasa microbiana son los que dieron concentración más alta (256 ppm). En los contrastes lineales se obtuvieron diferencias significativas en cuanto el tratamiento del centeno y la adición de la fitasa, aumentando ligeramente en los dos casos la concentración de este mineral en las excretas, mientras que en los análisis factoriales los dos factores no tuvieron efectos.

Por la retención del hierro, las concentraciones fueron más altas (73.85 ppm) cuando los pollos que ingirieron dietas control positivo sin pasar el trigo por autoclave. Sin embargo los otros tratamientos presentaron valores bajos y similares. El tratamiento del trigo dio diferencias significativas ($p < 0.01$), mientras que la adición y el nivel de la fitasa no tuvieron diferencias significativas por la retención del hierro. Los análisis factoriales (Tabla 21) nos confirmaron estos resultados excepto que el tratamiento del trigo no afectó la retención del hierro.

b- Experimento 2:

La cantidad de minerales en las excretas y la retención aparente del fósforo total y el calcio se muestran en la Tabla 22. Los pollos que ingirieron dietas controles positivos presentaron porcentajes más altos del fósforo total en las excretas (0.99% por T-1 y 0.95% por T-5), y en el resto de las seis dietas no hubo diferencias en la cantidad del fósforo en excretas y se mantiene entre 0.4 y 0.5%, pero ni por la adición de fitasa microbiana ni por el tratamiento del trigo ni por la dosis de la fitasa se encontraron diferencias significativas.

Se observaron diferencias significativas en la retención del fósforo total entre los tratamientos ($p < 0.01$). En las dietas con trigo no tratado, la adición de 5000 U/kg de fitasa microbiana mejoró significativamente los resultados tanto respecto al control positivo como al control negativo. No hubo diferencias entre los resultados dependiendo a la dosis añadida. Por otra parte, en las dietas con trigo pasado por autoclave, la reducción del fósforo no fitico de las dietas beneficia la retención del fósforo total, aumentándolo en torno de 10%, cantidad que sólo se mejoró numéricamente al añadir la fitasa microbiana (Tabla 23), mientras que el tratamiento del trigo no tuvo efecto sobre la retención del fósforo total.

Tabla 22: excreción de los minerales y retención aparente del fosforo total y del calcio en las dietas experimentales a base de trigo (análisis jerárquico).

Tratamiento	Trigo	Fosforo inorgánico	Fitasa añadida (U/g)	P total en excretas (%/MS)	P total retenido (%)	Ca en excretas (%/MS)	Ca retenido (%)	Zn en excretas (ppm)	Fe en excretas (ppm)
T-1	No tratado	0.45 %	-	0,99a	55,2c	2,24a	32,72d	244,68	747,85a
T-2	No tratado	0.27 %	-	0,48b	66,15b	1,02c	56,78a	217,58	696,55ab
T-3	No tratado	0.27 %	500	0,46b	70,98ab	1,02c	51,55b	226,87	648b
T-4	No tratado	0.27 %	5000	0,41b	75,48a	1.01c	52,49ab	231,65	658,82b
T-5	Autoclavado	0.45 %	-	0,95a	60,14c	2,14b	41,41c	218,78	739,3a
T-6	Autoclavado	0.27 %	-	0,49b	70,2ab	1.05c	52,81ab	233,75	676,58ab
T-7	Autoclavado	0.27 %	500	0,49b	70,6ab	1.03c	49,1b	223,1	739,92a
T-8	Autoclavado	0.27 %	5000	0,48b	71,3ab	0,97c	49,24b	233,18	731,3a
			Err.Es.	0,03	1,84	0,04	1,76	7,57	24,83
			P-valor	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	0,162	0,0055
Contrastes (P-valor)									
Nivel P: 0.45% vs 0.27% (T1+T5 vs T2+T6)				<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	0.3849	0.0124
No tratado vs. Autoclavado (T1 a T4 vs T5 a T8)				0.2614	0.9246	0.9268	0.0025	0.4036	0.0134
Sin fitasa vs. Fitasa (T2+T6 vs T3+4+T7+T8)				0.4652	0.0478	0.3263	0.0126	0.6060	0.6882
Dosis: 500 ppm vs 5000 ppm (T3+T7 vs T4+T8)				0.3742	0.2482	0.2562	0.6976	0.2766	0.9613

a, b, c, d: las medias dentro de una columna con diferentes superíndices son significativamente diferentes (P < 0.05).

Tabla 23: excreción de los minerales y retención aparente del fosforo total y del calcio en las dietas experimentales a base de trigo (análisis factorial).

Tratamiento	Trigo	Fosforo inorgánico	Fitasa añadida (U/g)	P total en excretas (%/MS)	P total retenido (%)	Ca en excretas (%/MS)	Ca retenido (%)	Zn en excretas (ppm)	Fe en excretas (ppm)
T-2	No tratado	0.27	-	0,48	66,15	1.02	56,78	217,58	696.6
T-3	No tratado	0.27	500	0,46	70,98	1.02	51,55	226,87	648,0
T-4	No tratado	0.27	5000	0,41	75,48	1.01	52,49	231,65	658.8
T-6	Autoclavado	0.27	-	0,49	70,2	1.05	52,81	233,75	676.6
T-7	Autoclavado	0.27	500	0,49	70,6	1.03	49,1	223,1	739.9
T-8	Autoclavado	0.27	5000	0,48	71,3	0.97	49,24	233,18	731.3
Fitasa, U/kg			0	0,48	68,17	10,3	54,83a	225,7	688,6
			500	0,48	70,79	10,2	50,33b	225,0	689,8
			5000	0,44	73,39	0,99	50,86b	232,4	691,0
			P-valor	0,3906	0,0515	0,265	0,027	0,5148	0,662
			DE	0,02	1,42	0,02	1,22	5	10,6
Trigo			No tratado	0,45	70,89	1,01	53,61a	225,4	668,3b
			Autoclavado	0,48	70,7	1,01	50,40b	230,0	717,8a
			P-valor	0,183	0,9175	0,9115	0,0267	0,4265	0,0012
			DE	0,02	1,16	0,02	0,98	4	8,9
Interacción Fitasa*Trigo			P-valor	0,5513	0,1454	0,5207	0,909	0,356	0,0009

a, b: las medias dentro de una columna con diferentes superíndices son significativamente diferentes ($P < 0.05$).

El nivel del calcio en las excretas está relacionada directamente con su inclusión en las dietas, como ocurre en el caso del fósforo. Las excretas correspondientes a los animales que ingirieron los controles positivo con trigo sin tratar (2.42% Ca) y con trigo pasado por autoclave (2.14% Ca) se encontró que eran los que tenían más calcio, mientras que las excretas correspondientes a los animales que ingirieron las otras dietas se encontró que presentaban valores más bajos, aproximadamente del 50%. Tanto en el estudio de los contrastes como en los análisis factoriales, ni la adición de fitasa microbiana ni el tratamiento del trigo ni el nivel de fitasa dieron resultados estadísticamente significativos.

En cuanto a la retención aparente del calcio las dietas control positivo (32.72% para T-1 y 41.41% para T-5) dieron valores más bajos que las retenciones de las otras dietas, donde se observa que el valor más alto de todos obtuvo por la dieta control negativo y con trigo sin tratar (56.78%). Por lo tanto, en las contrastes lineales, se ha visto que la adición de fitasa microbiana exógena produjo diferencias significativas ($p < 0.0126$), con una disminución de la retención, siendo el valor más alto cuando no hay enzima exógena, por otra parte, también se obtuvieron resultados estadísticamente significativos con una mayor retención cuando se utilizó dietas con trigo no tratado que cuando el trigo pasado por autoclave (53.61% en presencia de fitasa endógena y 50.4% sin fitasa endógena). Los resultados que obtuvieron en las contrastes lineales, se confirmaron por los análisis factoriales (Tabla 23), de modo que la adición de la fitasa microbiana o el tratamiento por autoclave del trigo disminuyó la retención del calcio ($p < 0.027$).

En cuanto la concentración del zinc en las excretas, no hubo diferencias significativas entre tratamientos. Tanto en las contrastes lineales como los análisis factoriales, ni la adición de la fitasa microbiana, ni el tratamiento del trigo, ni la dosis de la fitasa afectó la cantidad del zinc en las excretas, solo que en los análisis factoriales (Tabla 23), se puede decir que el tratamiento del trigo por autoclave aumentó ligeramente la concentración de este micromineral.

En el caso del hierro, se ve que hubo diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0,005$). La reducción de la concentración del fósforo en las dietas tuvo tendencia a disminuir la cantidad del hierro en las excretas, mientras que las concentraciones más bajas fueron correspondientes a las dietas control negativo, con fitasa exógena y con trigo no tratado (648 ppm para T-3 y 658,8 ppm para T-4). En contrastes lineales, la

adición de la fitasa microbiana no afectó la concentración del hierro en excretas, pero sí que se obtuvieron diferencias al analizar el tratamiento del trigo por autoclave ($p < 0,013$). Los análisis factoriales (Tabla 23) nos confirmaron estos resultados donde el tratamiento de trigo aumentó la concentración de este mineral en las excretas (717,8 ppm) frente (668,3 ppm) con trigo no tratado, mientras que la adición de la fitasa no afectó las concentraciones de este mineral en las excretas.

En los dos ensayos, la disminución del nivel del P de las dietas, muestra una aumentación de la retención del P y Ca y una disminución de sus concentraciones en las excretas. La adición de la fitasa microbiana a las dietas bajas en P produjo un mejoramiento de los valores del Ca sin afectar el P en las dietas a base de centeno, mientras que disminuyó la retención del Ca y produjo un ligero mejoramiento en la retención del P en las dietas a base de trigo. El tratamiento de los cereales por autoclave mejoró la retención del Ca en las dietas a base de centeno, lo que es el contrario con las dietas a base de trigo donde lo empeoró, sin embargo no tuvo efecto sobre las concentraciones del P. la disminución del nivel del P en las dietas a base de centeno disminuyó la excreción del Zn y no afectó la excreción del Fe, mientras que en las dietas a base de trigo, disminuyó la excreción del Fe sin afectar el Zn. La adición de la fitasa microbiana, no afectó las concentraciones del Zn y Fe en las excretas en los dos ensayos. Sin embargo el tratamiento del trigo aumentó la excreción de Fe y no tuvo efecto sobre los dos minerales en las dietas a base de centeno.

IV.5. Ingesta de los minerales:

a- Experimento 1:

La Tabla 24, muestra la ingesta de los minerales de las dietas experimentales. La disminución de la concentración del PNP en las dietas experimentales redujo la ingesta del P total y del Ca. La ingesta del P mejoró con la adición de la fitasa microbiana, ya sea el centeno tratado o no tratado ($p < 0,026$). Tanto en los contrastes lineales como en los análisis factoriales (Tabla 25), la adición de la fitasa microbiana y el tratamiento del centeno por autoclave produjeron una mejora de la ingesta del fósforo. La reducción de la concentración del fósforo en las dietas, disminuyó la ingesta del calcio, que no se vio afectada por la adición de la fitasa microbiana, mientras que el tratamiento del centeno por autoclave, mejoró la ingesta de este mineral. En ambas Tablas (24 y 25), la adición

de la fitasa microbiana no afectó la ingesta del calcio pero sí se vio incrementada por el tratamiento del centeno.

Tabla 24: ingesta de los minerales de las dietas experimentales a base de centeno (análisis jerárquico).

Tratamiento	Centeno	P inorgánico	Fitasa añadida (U/g)	P total (mg)	Ca (mg)	Zn (mg)	Fe (mg)
T-1	No tratado	0.45 %	-	220.70a	338.20a	2.13abc	7.90a
T-2	No tratado	0.27 %	-	127.58e	196.50de	2.10bc	6.27bc
T-3	No tratado	0.27 %	500	130.96de	189.52de	1.96c	6.40bc
T-4	No tratado	0.27 %	5000	142.68cde	175.60e	1.97c	6.55bc
T-5	Autoclavado	0.45 %	-	221.80a	310.53b	1.96c	6.72bc
T-6	Autoclavado	0.27 %	-	147.30cd	211.95dc	2.26ab	6.25c
T-7	Autoclavado	0.27 %	500	156.06bc	234.13c	2.34a	6.98b
T-8	Autoclavado	0.27 %	5000	167.15b	222.83c	2.23ab	7.80a
Err.Es.				5.6	8,05	0,07	0,21
P-valor				< 0,0001	<0,0001	0,0012	< 0,0001
Contraste (P-valor)							
Nivel P: 0.45% vs 0.27% (T1+T5 vs T2+T6)				<.0001	<.0001	0.0617	<.0001
No tratado vs. Autoclavado (T1 a T4 vs T5 a T8)				0.0001	0.0018	0.0038	0.3254
Sin fitasa vs. Fitasa (T2+T6 vs T3+4+T7+T8)				0.0259	0.8603	0.3717	0.0015
Dosis: 500 ppm vs 5000 ppm (T3+T7 vs T4+T8)				0.0593	0.1440	0.4947	0.0410

a, b, c, d, e: las medias dentro de una columna con diferentes superíndices son significativamente diferentes ($P < 0.05$).

Referente a la ingesta de Zn y Fe, hubo diferencias significativas entre tratamientos. La disminución de la concentración del PNP en las dietas experimentales, redujo la ingesta del Fe sin afectar la del Zn. La adición de la fitasa microbiana mejoró la ingesta de Fe sólo en las dietas con centeno autoclavado, en donde las dosis altas dieron valores de ingesta más elevados (6.98 mg para T-7 y 7.80 para T-8) y no afectó la del Zn. En la evaluación por contrastes lineales, el tratamiento del centeno aumentó la ingesta del Zn ($p < 0.0038$) y no tuvo efecto sobre la ingesta del Fe. Sin embargo, la adición de la fitasa exógena aumentó sólo la ingesta del Fe, sobre todo con dosis más altas ($p < 0.041$).

En los análisis factoriales (Tabla 25) se observó que la adición creciente de la fitasa microbiana aumentó sólo la ingesta del Fe, sin afectar la del Zn, mientras que el tratamiento del centeno por autoclave mejoró tanto la ingesta del Zn como la del Fe.

Tabla 25: ingesta de los minerales de las dietas experimentales a base de centeno (análisis factorial).

Tratamiento	Centeno	P inorgánico	Fitasa añadida (U/g)	P total (mg)	Ca (mg)	Zn (mg)	Fe (mg)
T-2	No tratado	0.27	-	127.58	196.50	2.10	6.27
T-3	No tratado	0.27	500	130.96	189.52	1.96	6.40
T-4	No tratado	0.27	5000	142.68	175.60	1.97	6.55
T-6	Autoclavado	0.27	-	147.30	211.95	2.26	6.25
T-7	Autoclavado	0.27	500	156.07	234.13	2.34	6.98
T-8	Autoclavado	0.27	5000	167.15	222.83	2.23	7.80
Fitasa, U/kg			0	138.33b	20.492	2.19	6.26c
			500	144.65b	21.385	2.16	6.72b
			5000	156.02a	20.136	2.11	7.23a
			P-valor	0.0042	0.2074	0.5300	0.0010
			DE	3,4	0,85	0,05	0,15
Centeno			No tratado	133.74b	187.26b	2.01b	6.41b
			Autoclavado	156.83a	222.97a	2.27a	7.01a
			P-valor	<.0001	<.0001	0.0001	0.0019
			DE	2,6	0,7	0,04	0,12
Interacción Fitasa*Centeno			P-valor	0.8312	0.0557	0.3356	0.0212

a, b, c: las medias dentro de una columna con diferentes superíndices son significativamente diferentes ($P < 0.05$)

b- Experimento 2:

La disminución de la concentración del PNP en las dietas experimentales, se ve reflejada en los datos de la ingestión del P total (Tabla 26). Los pollos que ingirieron menos P fueron los que comieron piensos que tenía un nivel de PNP de 2.7 g / kg sin enzima añadida, independientemente del tratamiento del cereal por autoclave, aunque que este último es en el que tuvo una menor ingesta. En la evaluación por contrastes lineales, la adición de la fitasa exógena produjo una mejora de la ingesta del P, aunque no se observaron diferencias entre los que ingirieron 500 o 5000 U/kg de fitasa microbiana. Sin embargo, los animales que fueron alimentados con dietas a base de trigo autoclavado, son los que ingirieron más fósforo que los demás. En los análisis factoriales (Tabla 27), tanto la adición de fitasa microbiana como el tratamiento del trigo por autoclave mejoraron la ingesta del fósforo.

La ingesta del calcio por los pollos disminuyó, asimismo con la reducción del fósforo en las dietas experimentales ($p < 0.0001$). Evaluando los contrastes lineales se observó que (Tabla 26), ni la adición de la fitasa microbiana, ni el tratamiento del trigo por autoclave produjo mejoras en la ingesta de este mineral. Sin embargo, en los análisis factoriales (Tabla 27), ambos dos factores disminuyeron la ingesta del calcio.

Tabla 26: ingesta de los minerales de las dietas experimentales a base de trigo (análisis jerárquico).

Tratamiento	Trigo	P inorgánico	Fitasa añadida (U/g)	P total (mg)	Ca (mg)	Zn (mg)	Fe (mg)
T-1	No tratado	0.45 %	-	300.35b	441.06b	3.01b	8.48bc
T-2	No tratado	0.27 %	-	183.39f	304.75c	2.77c	9.15a
T-3	No tratado	0.27 %	500	209.62cde	276.16d	2.82c	7.36d
T-4	No tratado	0.27 %	5000	204.83de	258.90de	2.59d	8.82ab
T-5	Autoclavado	0.45 %	-	319.46a	484.71a	3.66a	8.38bc
T-6	Autoclavado	0.27 %	-	201.84e	269.00d	2.95bc	8.64b
T-7	Autoclavado	0.27 %	500	220.28c	266.52d	2.79c	8.07c
T-8	Autoclavado	0.27 %	5000	217.57cd	248.99e	3.04b	8.55bc
Err.Es.				4.79	6.09	0.06	0.18
P-valor				<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.001
Contraste (P-valor)							
Nivel P: 0.45% vs 0.27% (T1+T5 vs T2+T6)				0.0001	0.0001	0.001	0.12
No tratado vs. Autoclavado (T1 a T4 vs T5 a T8)				0.05	0.55	0.002	0.69
Sin fitasa vs. Fitasa (T2+T6 vs T3+4+T7+T8)				0.004	0.09	0.81	0.11
Dosis: 500 ppm vs 5000 ppm (T3+T7 vs T4+T8)				0.14	0.76	0.04	0.0001

a, b, c, d, e, f: las medias dentro de una columna con diferentes superíndices son significativamente diferentes ($P < 0.05$).

En cuanto a la ingesta del hierro y el zinc, se encontraron diferencias significativas entre tratamientos. La reducción del fósforo en las dietas experimentales, redujo la ingesta del zinc y la ingesta del hierro aumentó al no tratar el trigo y con nivel bajo en fósforo (9.15 mg). Los contrastes lineales mostraron que la adición de la fitasa microbiana, no afectó la ingesta de los dos minerales, ya sea el trigo tratado o no tratado. Sin embargo, las dosis altas de la fitasa microbiana aumentaron la ingesta del zinc y el hierro ($p < 0.04$), ($p < 0.0001$) respectivamente. El tratamiento del trigo mejoró sólo la ingesta del zinc, sin afectar la del hierro. En los análisis factoriales (Tabla 27), no hubo efecto de la fitasa exógena sobre la ingesta del zinc, pero sí sobre la del hierro, donde las dosis altas (5000U/kg), mostraron valores superiores de ingesta que las observadas con las dietas de (500U/kg) de fitasa. Por otra parte el tratamiento del trigo por autoclave, produjo mejoras en la ingestión del zinc, sin afectar la del hierro; además se observaron interacciones significativas entre la fitasa y el trigo en la ingesta del zinc y el hierro.

Tabla 27: ingesta de los minerales de las dietas experimentales a base de trigo (análisis factorial)

Tratamiento	Trigo	P inorgánico	Fitasa añadida (U/g)	P total (mg)	Ca (mg)	Zn (mg)	Fe (mg)
T-2	No tratado	0.27	-	183.39	304.75	2.77	9.15
T-3	No tratado	0.27	500	209.62	276.16	2.82	7.36
T-4	No tratado	0.27	5000	204.83	258.90	2.59	8.82
T-6	Autoclavado	0.27	-	201.84	269.00	2.95	8.64
T-7	Autoclavado	0.27	500	220.28	266.52	2.79	807
T-8	Autoclavado	0.27	5000	217.57	248.99	3.04	8.55
Fitasa, U/kg			0	192.69b	286.90a	2.86	8.90a
			500	214.95a	271.34b	2.80	7.71b
			5000	211.20a	253.94c	2.81	8.69a
			P-valor	<0.0001	<0.0001	0.6442	<0.0001
			DE	3.40	4.20	0.05	0.13
Trigo			No tratado	199.28b	279.94a	2.72b	8.44
			Autoclavado	213.28a	261.52b	2.92a	8.42
			P-valor	0.0012	0.0006	0.0006	0.8744
			DE	2.73	3.36	0.04	0.11
Interacción Fitasa*Trigo			P-valor	0.6940	0.0542	0.0024	0.0062

a, b, c: las medias dentro de una columna con diferentes superíndices son significativamente diferentes (P < 0.05).

V. Discusión:

En los dos ensayos se demostró el efecto de la autoclave sobre la actividad fitasica endógena de los dos cereales, donde el tratamiento térmico tuvo su efecto esperado y desactivó la fitasa endógena de los dos cereales. Las altas temperaturas produjeron una pérdida de la estructura de la enzima, y por tanto una desnaturalización, como cualquier otra proteína. Este cambio de configuración de la enzima puede verse amplificado por la humedad en el proceso de calentamiento (**Ward, 2002**). Los estudios de **Steiner et al. (2007)** encontraron que la actividad fitasica del centeno fue mucho más alta de la del trigo, coincidiendo con los resultados obtenidos en nuestro estudio.

En el caso del centeno, la adición creciente de la fitasa microbiana en dietas bajas en fósforo produce cambios en los parámetros productivos, siendo los mejores los correspondientes a las dietas formuladas valores más altos de la fitasa exógena (5000 U/kg) tanto en el caso del centeno tratado o no tratado, sin afectar el índice de conversión. Existen tres mecanismos principales que pueden justificar el efecto beneficioso de la alta dosis de fitasa microbiana:

- 1) La restauración del equilibrio tras la liberación de nutrientes, en particular para el Ca y P
- 2) Destrucción más rápida y completa del fitato, con beneficios concomitantes en las pérdidas endógenas.
- 3) La generación de ésteres de bajo peso molecular de IP, con solubilidad más persistente en el intestino delgado, que permite la absorción de fósforo (**Cowieson et al. 2011**).

De forma similar, el tratamiento del centeno por autoclave, mejora los parámetros productivos, excepto el índice de conversión. **Teinge et al. (1991)**, describió que el tratamiento del centeno por autoclave mejoró los parámetros productivos, en combinación con una enzima pentosanasa, o en combinación con un tratamiento con ácido 0.2 N HCL (0.5 L/kg de centeno, durante 5 min); la mejora debido al tratamiento con ácido/autoclave puede explicarse sobre la base de la hidrólisis de pentosanos y la formación de azúcares solubles.

Durante el proceso térmico, puede romperse la estructura de las paredes celulares, lo que resulta en una mayor solubilización, sin degradación real de algunos de los polímeros de los polisacáridos no amiláceos (NPS), a menudo resulta un aumento de la viscosidad (**Vries et al. 2012**). De acuerdo con **Reddy et al. (1989)**, el tratamiento por calor puede causar una gelatinización de las moléculas de almidón, lo que conllevaría un incremento de la viscosidad intestinal de los pollos que ingieren dietas a base de cereal autoclavado. En este caso, el tratamiento del centeno por autoclave, fue el único factor determinante de la viscosidad intestinal, en donde se redujo la viscosidad intestinal de los pollos que ingirieron las dietas a base de centeno autoclavado.

La adición de la fitasa microbiana en las dietas bajas en fosforo a base de trigo, produjo en general cambios positivos en los parámetros productivos de los pollos. Aunque en ningún caso se alcanzaron los valores obtenidos en las dieta control positivo, la adición de fitasa microbiana provocó mejoras en los resultados productivos respecto a los controles negativos. Con la incorporación de 5000 U/kg de fitasa los pesos finales de los pollos fue ligeramente superior, pero no diferentes de los que comieron dietas con 500 U / kg (dosis habitual). En este ensayo, la adición creciente de fitasa mejoró el índice de conversión frente al control negativo. Es bien conocido, y está bien documentado en la

bibliografía que la adición de fitasa microbiana en dietas deficientes de fósforo produce mejoras en los parámetros productivos (ganancia de peso e índice de transformación) ya sea en dietas de trigo o en otros tipos de dietas (**Singh et al. 2008**).

El tratamiento del trigo por autoclave, mejoró los parámetros productivos de los pollos, pero empeoró el índice de conversión, respecto al de los animales que ingirieron trigo no tratado. Asimismo los valores de la viscosidad intestinal de los animales fueron un poco más altos. **Juanpere et al. (2004)**, encontraron que el tratamiento de la cebada por autoclave a 105°C durante 15 min incrementó la viscosidad intestinal de los animales, empeoró el índice de conversión, y no tuvo efecto sobre los otros parámetros productivos.

Aunque podría esperarse que la adición de la fitasa microbiana a las dietas aumentara la digestibilidad de la proteína y la de la energía, esto no siempre ha observado en los estudios realizados por otros investigadores. Así, **Ravindran et al. 2000** encontró una mejora en estos parámetros, mientras que **Woyengo et al. (2008)** no obtuvo ningún efecto con la adición de la fitasa microbiana. En nuestros estudios, la digestibilidad de la energía y de la proteína no se afectó en las dietas a base de centeno con la adición de la fitasa microbiana, ya sea el cereal tratado o no tratado. Sin embargo, se ha observado el efecto del tratamiento del centeno por autoclave, en donde la digestibilidad de la energía tiende a aumentar con el tratamiento del cereal.

En el ensayo 2, la inclusión de la fitasa microbiana a las dietas a base de trigo, no produjo variaciones en el valor energético de las dietas. Solo se vieron diferencias al contrastar la dosis de 500 frente 5000 U/kg. Con la dosis superior de fitasa exógena, se obtuvieron los valores más elevados de energía, propiciado por una mayor contribución proteica, a tenor de los valores de la digestibilidad ileal de proteína obtenidos. Podría decirse que el valor alto de la fitasa microbiana ha hecho su función correctamente, facilitando que más haya proteína digestible, y más energía asimilable por los pollos. **Shirley et al. (2003)**, encontró que la adición creciente de una fitasa microbiana de 0 a 12000 U/kg, mejoró la retención del nitrógeno del 58 al 78% y aumentó los valores de la EMAn de 3216 a 3415 Kcal/kg. Pero estos resultados no parecieron afectar al crecimiento, donde los animales presentaron igual peso con dosis de 500 y 5000 U/kg de fitasa.

Hemos visto que el tratamiento del trigo por autoclave no tuvo efecto sobre la digestibilidad de la proteína, mientras que mejoró los valores de la energía metabolizable aparente. Según **Kinafar et al. 2013**; el uso de trigo tratado por autoclave como dieta de base a los codornices, mejoró los valores de la energía metabolizable y los parámetros productivos de estos animales.

La adición de la fitasa microbiana a las dietas experimentales (trigo o centeno) no produjo grandes variaciones en la concentración de los minerales en la sangre. El factor más importante fue el PNP en donde en las dietas control positivo siempre dieron valores más altos que los del control negativo, mientras la adición de niveles crecientes de la enzima a las dietas control negativo ya sea el cereal tratado o no tratado, aumentó los valores del P en la sangre, alcanzándose las concentraciones más altas con 5000 U/kg. Sin embargo, el tratamiento del centeno por autoclave tuvo un efecto inverso, se redujo la concentración plasmática de este mineral, y además se encontró una interacción entre los dos factores, la fitasa exógena y el tratamiento del centeno.

En contraste, en ambos ensayos, las concentraciones del Ca en la sangre alcanzaron valores altos con las dietas control positivo, mientras que la adición de fitasa exógena no produjo cambios respecto al control negativo. En cuanto al tipo del cereal, las concentraciones plasmáticas del calcio aumentan con el tratamiento del centeno por autoclave, mientras que no tuvo efecto con trigo autoclavado. Estos resultados coinciden con los resultados de (**Shirley et al. 2003 y Lan et al. 2002**), donde encontraron que la adición creciente de fitasa exógena a dietas a base de maíz y harina de soja mejoró las concentraciones plasmáticas del P, sin efecto sobre los valores del Ca. Las diferencias de los resultados pueden ser debidas a las diferentes concentraciones del PNP y el Ca y otros componentes en las dietas experimentales.

Referente a los otros minerales en el ensayo 1, las concentraciones en sangre del Zn y Fe no se afectaron por la adición de la fitasa microbiana, ni por el tratamiento del cereal por autoclave, excepto que se obtuvo una interacción entre la fitasa microbiana y el tratamiento del centeno. Sin embargo, en el ensayo 2, la adición de dosis habituales (500 U/kg) de la fitasa microbiana dio concentraciones más altas del Fe en el plasma, sin afectar los valores del Zn. Estos resultados no coinciden con los encontrados por (**Paik et al. 2000**), que mostraron que la adición de una fitasa microbiana a dietas bajas

en P, aumentaba los valores plasmáticos de estos minerales, y la disminución de nivel de PNP en las dietas experimentales aumentó la concentración plasmática de Fe.

La disminución del nivel de PNP en las dietas experimentales, tiende a bajar las concentraciones de las cenizas de los dedos, mientras que la adición creciente de la fitasa microbiana aumentó sus valores. Estos resultados coinciden con los encontrados por **Cowieson et al. (2006)** y **Lan et al. (2002)**. Ambos parámetros (niveles plasmáticos de P y porcentaje de cenizas en hueso) han demostrado ser buenos biomarcadores de la disponibilidad del P de la dieta.

En los dos experimentos, la adición de la fitasa microbiana incrementó la retención del P hasta un 5% pero las mejoras fueron solo numéricamente distintas, y solo se observaron mejoras significativas en la retención del fósforo de las dietas de trigo no tratado. En el caso del calcio, la adición de fitasa redujo la cantidad de calcio en las excretas, lo que modificó los valores de retención de este elemento, de forma similar la descrita por tal como se ha observado en la bibliografía (**Pérez-Vendrell et al. 2001**, **Cowieson et al. 2006**), la disminución de la concentración del fósforo en las dietas produce un aumento de la retención aparente del fósforo total y del calcio y la adición de la fitasa microbiana aumenta más la retención de estos minerales, de forma marginal. En nuestros ensayos, y aparentemente tiene mayor importancia la disminución del fósforo de las dietas que la adición de la fitasa exógena. Por otra parte la adición de la fitasa microbiana a las dietas a base de centeno aumentó la retención del calcio sobre todo cuando se usó un centeno tratado por autoclave; esta mejora puede explicarse por la desactivación de la fitasa endógena que puede bajar la unión del calcio con el ácido fítico con la defosforilación de este último (**Woyengo et al. 2008**). Se espera que la adición de la fitasa microbiana aumente la disponibilidad del calcio por la liberación de este mineral ligado con el ácido fítico. Sin embargo, la suplementación de la fitasa microbiana a las dietas a base de trigo redujo la retención del calcio, que no está de acuerdo con los resultados obtenidos por (**Lan et al. 2002** y **Juanpere et al. 2004**). Una causa que puede justificar esta diversidad de resultados podría ser la menor relación Ca:P. En este ensayo se estableció una relación 2:1, a partir de estudios realizados por otros investigadores (**Dieckmann y col., 2002**), los cuales indican que los mejores resultados tanto en parámetros productivos como en retención mineral se obtienen cuando la relación se encuentra entre 1:1 y 2:1. Cuando la relación de Ca:P es superior a estos valores, el efecto del enzima es más evidente.

Está bien documentado que la adición de la fitasa microbiana reduce la excreción del fósforo y el calcio (**Paik et al. 2000 y Cowieson et al. 2004**). En nuestros dos ensayos la disminución del nivel del fósforo en las dietas redujo la excreción del fósforo y el calcio. La adición de la fitasa exógena no produjo modificaciones significativas, pero mantuvo la excreción de estos dos minerales más baja que los controles positivos, excepto en las dietas a base de centeno donde la fitasa microbiana redujo más la excreción del calcio. Esto sugiere que aunque el fósforo fítico se hidrolizó, liberando el fosfato, los pollos no retuvieron los fosfatos liberados o el turnover del fósforo incrementó, o debido a la actividad de las fosfatasa endógenas de los pollos que pueden hidrolizar el ácido fítico(**Cowieson et al. 2004**).

La adición de la fitasa microbiana a las dietas a base de centeno o a base de trigo no disminuyó la excreción del zinc y del hierro, incluso el tratamiento del trigo tuvo un efecto negativo y aumentó la excreción del hierro, coincidiendo con los resultados obtenidos por (**Um et al. 2000**).

La ingesta de los minerales está bien relacionada con la ingesta global de las dietas. Es conocido que la disminución de la concentración del fósforo en las dietas experimentales produce una disminución de la ingesta del pienso (**Saxena, 1996**). En estos dos ensayos, se ha observado que la reducción del PNP en las dietas, disminuyó la ingesta del fósforo y del calcio, ya sea el cereal tratado o no tratado por autoclave. La adición de la fitasa microbiana mejoró la ingesta del fósforo en los dos ensayos, sin tener efecto sobre la ingesta del calcio en las dietas a base de centeno, pero en las dietas a base de trigo tuvo un efecto negativo sobre la ingestión del calcio, donde los animales que comieron dietas sin fitasa microbiana, ingirieron más calcio que las que tenían fitasa microbiana. (**Pirgozliev et al. 2008**), reportaron asimismo, que la adición de fitasa microbiana a dietas a base de maíz y harina de soja, aumentó la ingesta del fósforo un 14% respecto al control negativo, mientras que no afectó la ingesta del calcio y del zinc.

El tratamiento por autoclave de los dos cereales, produjo un aumento de la ingesta del fósforo y del zinc, pero redujo la ingesta del calcio.

VI. Conclusiones:

- 1- La actividad de la fitasa endógena del centeno es más alta que la del trigo. Esta actividad fitasica se puede eliminar por el tratamiento térmico por autoclave, a temperaturas superiores de 100°C en un periodo de tiempo entre 10 y 15 minutos.
- 2 - En ambos casos, la deficiencia de fósforo produjo una disminución significativa del crecimiento de los animales, que fue paliada por la incorporación del enzima. La utilización de fitasa (y mejor a niveles altos) en dietas para pollos formuladas con bajos niveles de fosforo inorgánico, permite mantener e incluso mejorar el crecimiento de los animales y su productividad.
- 3- La utilización de una dosis elevada (5000 U/kg) de fitasa microbiana, produjo mejores resultados de los parámetros productivos y digestibilidad de nutrientes, disminuyendo la viscosidad intestinal y aumentando los valores de la energía con respecto a las dosis habituales de fitasa microbiana; no mostrando ningún efecto adverso de la dosis de tolerancia a esta enzima.
- 4- La adición de fitasa incrementa la retención mineral, y reduce en mas de un 50% la excreción de fosforo y calcio, a través de las deyecciones al medio ambiente.
- 5 - El nivel de P en sangre y/o el porcentaje de cenizas en dedos se han identificado como buenos indicadores del fosforo disponible de las dietas en pollos de carne en crecimiento.
- 6- La viscosidad intestinal producida por las dietas a base de centeno es mucho más alta que la del trigo.
- 7- El proceso de autoclave utilizado para evaluar la importancia de la fitasa endógena de los cereales, no ha sido un buen procedimiento ya que, además de inactivar el enzima, modifica otros aspectos del cereal, como la estructura del almidón o la relación de carbohidratos solubles/insolubles. Ello dificulta obtener conclusiones del papel de la fitasa endógena en los parámetros productivos o de retención de minerales.

VII- Bibliografía:

- Adeola. O and Sands. J. S.** 2003. Does supplemental dietary microbial phytase improve amino acid utilization? A perspective that it does not. *J. Anim. Sci.* 81. 78–85.
- Ahmad, T., Rassol, S., Sarwar, M., Haq, A. and Hasan, Z.** 2000. Effect of microbial phytase produced from a fungus *Aspergillus niger* on bioavailability of phosphorus and calcium in broiler chicken. *Animal Feed Science and Technology* 83: 103-114.
- Angel, R., Tamim, N. M., Applegate, T. J. Dhandu, A. S. and Ellestad, L. E.** 2002. Phytic acid chemistry : Influence on phytin-phosphorus availability and phytase efficacy. *J. Appl. Poult. Res.* 11 : 471-480.
- Angel, R., Saylor, W.W., Dhandu, A.S., Powers, W., Applegate, T.J.,** 2005. Effects of dietary phosphorus, phytase and 25-hydroxycholecalciferol on performance of broiler chickens grown in floor pens. *Poult. Sci.* 84:1031–1044.
- Angel, R.** 2009. Calcium and phosphorus requirements in broilers: A moving target. *Proceedings of the Carolina Poultry Nutrition Conference*, Research Triangle Park, NC, November 11, 2009.
- Augspurger, N.R., Baker, D.H.,** 2004. High dietary phytase levels maximize phytate-phosphorus utilization but do not affect protein utilization in chicks fed phosphorus- or amino acid-deficient diets. *J. Anim. Sci.* 82, 1100–1107.
- Beckers. Y, Piron. F.** 2009. Utilisation des enzymes exogènes en alimentation porcine et avicole. 9ème Journée Productions porcines et avicoles.
- Biehl. R. R., Emmert . J. L., and Baker .D. H.** 1997. Iron bioavailability in soybean meal as affected by supplemental phytase and 1 α -hydroxycholecalciferol. *Poult. Sci.* 76:1424-1427.
- Bohn.L,Meyer. A S,Rasmussen.S. K.** 2008. Phytate: impact on environment and human nutrition. A challenge for molecular breeding. *J Zhejiang Univ Sci B* 9:165-191.

- Cabahug, S., Ravindran, V., Selle, P.H., Bryden, W.L.,** 1999. Response of broiler chickens to microbial phytase as influenced by dietary phytic acid and non-phytate phosphorus levels. I. Effects on bird performance and toe ash content. *Br. Poult. Sci.* 40, 660–666.
- Cheryan, M.** 1980. Phytic acid interactions in food systems. *CRC Crit. Rev. FoodSci.Nutr.* 13 : 297-335.
- Cowieson.A.J, Acamovic.T, Bedford.M.R.** 2004. The effects of phytase and phytic acid on the loss of endogenous aminoacids and minerals from broiler chickens. *British Poultry Science.* 45:101–108.
- Cowieson, A. J., Acamovic, T. and Bedford, M. R.** 2006. Supplementation of corn-soy-based diets with an *Escherichia coli*-derived phytase: effects on broiler chick performance and the digestibility of amino acids and metabolizability of minerals and energy. *Poult. Sci.* 85: 1389-1397.
- Cowieson, A. J., Wilcock. P., Bedford, M. R.** 2011. Super-dosing effects of phytase in poultry and other monogastrics. *World's Poultry Science Journal.* 67:225-236.
- Dieckmann, A., R. Timmler, M. Rodehutschord.** 2002. Investigation on the optimal Ca:P ration in studies on P availability in broiler chicken. *En: Proc. 11th European Poultry Conference. Bremen, Alemania,* p. 104
- Ebrahimnezhad.Y, Ghyasi Gale-Kandi. J, Farahvash. T and Yeganeh. A. R.** 2011. Effect of combination of citric acid and microbial phytase on digestibility of calcium, phosphorous and mineralization parameters of tibia bone in broilers. *African Journal of Biotechnology.* 10: 15089-15093.
- ENFEMA.** 2002. Bioavailability of major and trace minerals. (eds. by Jongbloed A.W, Kemme P.A, de Groote G, Lippens. M & Meschy. F). International Association of the European Manufacturers of Major, Trace and Specific Feed Mineral Materials.
- Engelen, A. J., F. C. Van der Heeft, P. H. G. Randsdorp, and E. L. C. Smit.** 1994. Simple and rapid determination of phytase activity. *J. AOAC Int.* 77:760–764.

- FrontelaSaseta. C.** 2007. Efecto de la adición de fitasa sobre la biodisponibilidad mineral *in vitro* en papillas infantiles. Tesis doctoral. Universidad Murcia.
- Haefner, S., Knietsch, A., Scholten, E., Braun, J., Lohscheidt, M., Zelder, O.** 2005. Biotechnological production and application of phytases. *Appl. Microbial. Biotechnol.* 68, 588–597.
- Han. Y.M, Lei. X.G.**1999. Role of glycosylation in the functional expression of an *Aspergillus niger* phytase (*phyA*) in *Pichiapastoris*. *Arch. Biochem. Biophys.*364: 83–90.
- Hurrell. R.F., Juillerat.M.A., Reddy. M.B., Lynch. S.R., Dassenko. S.A., Cook.J.D.** 1992. Soyprotein, phytate, and iron absorption in humans. *Am. J. Clin. Nutr.* 56:573 578.
- Igbasan.F.A, Männer. K, Miksch. G, Borriss. R, Farouk.A, Simon O.** 2000.Comparative studies on the *in vitro* properties of phytases from various microbial origins. *Arch. Anim. Nutr.* 53: 353–373.
- Jagger, S., Wiseman, J., Cole, D.J.A., Craigon, J.,** 1992. Evaluation of inert markers of ileal and faecal apparent digestibility values in the pig. *Br. J. Nutr.* 68, 729–739.
- Juanpere. J.** 2006. Efectes de l'ús de fonts exògenes de fitasa sobre els rendiments productius i valor nutricional de les dietes riques en polisacàrids no midó (NSP) en pollastres broilers, repercussions mediambientals.Tesis doctoral. Universitat Rovirai Virgili.
- Juanpere.J, Perez-Vendrell. A. M, Angulo. E, and Brufau. J.** 2005. Assessment of Potential Interactions Between Phytase and Glycosidase Enzyme Supplementation on Nutrient Digestibility in Broilers. *Poultry Science.* 84:571–580.
- Kianfar. R, Moravej. H, Shivazad. M, Taghinejad-Roudbaneh. M &Shahrasb. M. A.** 2013.The effects of dry heat processing, autoclaving and enzyme supplementation on the nutritive value of wheat for growing Japanese quails. *Journal of Applied Animal Research.* 41: 93-102.

- Kumar.V, Sinha .A. K., Makkar. H. P.S, Becker.K.** 2010. Dietary roles of phytate and phytase in human nutrition: A review. *Food Chemistry* 120:945–959.
- Lan, G. Q., N. Abdullah, S. Jalaludin, and Y. W. Ho.** 2002. Efficacy of supplementation of a phytase-producing bacterial culture on the performance and nutrient use of broiler chickens fed corn-soybean meal diets. *Poult. Sci.* 81:1522-1532.
- Leeson, S. and Summers, J. D.** 2005. *Commercial poultry nutrition*. 3rd edition, University Books, Guelph, Ontario, Canada. Page 95.
- Lei. XG, Porres. J. M.** 2003. Phytase enzymology, applications, and biotechnology. *Biotechnology Letters* 25: 1787–1794.
- Liu.B.L,Rafiq. A,Tzeng.Y. M,Rob. A.** 1998. The induction and characterization of phytase and beyond. *Enzyme and Microbial Technology* 22:415–424.
- Martin, E.A., Nolan, J.V., Nitsan, Z., Farrell, D.J.,** 1998. Strategies to improve the nutritive value of rice bran in poultry diets. IV. Effects of addition of fish meal and a microbial phytase to duckling diets on bird performance and amino acid digestibility. *Br. Poult. Sci.* 39, 612–621.
- Mellef .J, Dridi .A., El bahri. L., Belhaj. O.** 2010. Revue des effets de l'ajout de phytase microbienne sur la biodisponibilité du phosphore et les performances des volailles. *Revue Méd.Vét.* 7, 342-352.
- Mohahna, C. and Nys, N.** 1999.Changes in zinc and manganese availability in broilers chicks induced by vegetal and microbial phytase. *Animal Feed Science and Technology* 77: 241-253.
- Narcy. A., Jondreville. C., Letourneau-Montminy.M.P., Magnin. M. &Nys. Y.** 2009. Voies nutritionnelles d'économie de phosphore chez le poulet. 8èmes Journées de la Recherche Avicole.115-123.
- National Research Council.** 1994. *Nutrient Requirements of Poultry*. 9th rev. ed. National Academy Press, Washington, DC.

- Nelson, T.S., Shieh, T.R., Wodzinski, R.J. and Ware, J.H.** 1971. Effect of supplemental phytase on the utilization of phytate phosphorus by chicks. *Journal of Nutrition* 101: 1289-1294.
- Paik, I. K, Um. J. S, Lee. S. J, and Lee. J. G.** 2000. Evaluation of the efficacy of crude phytase preparations in broiler chickens. *Asian-Aus. J. Anim. Sci.* 13:673-680.
- Pérez-Vendrell. A.M., Angulo. E., Brufau. J.** 2001. Effects of microbial phytase on apparent retention of phosphorus, calcium and zinc in broilers according to type of diet. *Cahiers Options Méditerranéennes* 54:191-195.
- Pirgozliev. V, O. Oduguwa , T. Acamovic & M.R. Bedford.** 2008. Effects of dietary phytase on performance and nutrient metabolism in chickens. *British Poultry Science.* 49:144-154.
- Powers.W and Angel. R.** 2008. A Review of the Capacity for Nutritional Strategies to Address Environmental Challenges in Poultry Production. *Poult. Sci.* 87: 1929-1938.
- Quian. H., Kornegay. E. T. and Denbow. D. M.** 1997. Utilization of phytate and calcium as influenced by microbial phytase, cholecalciferol, and the calcium: total phosphorus ration in broiler diets. *Poult. Sci.* 76 : 37-46.
- Ravindran. V, Cabahug. S, Selle. P.H & Bryden.W.L.** 2000. Response of broiler chickens to microbial phytase supplementation as influenced by dietary phytic acid and non-phytate phosphorus levels. II. Effects on apparent metabolisable energy, nutrient digestibility and nutrient retention. *British Poultry Science* 41, 193-200.
- Reddy, N.K., Pierson, M.D., Sathe, S.K., Salunkhe, D.K.,** 1989. *Phytates in Cereals and Legumes.* CRC Press, Boca Raton.
- Rodriguez. E, Porres. J.M, Han. Y, Lei. X.G.** 1999. Different sensitivity of recombinant *Aspergillus niger* phytase (r-PhyA) and *Escherichia coli* pH 2.5 acid phosphatase (r-ppA) to trypsin and pepsin *in vitro*. *Arch. Biochem. Biophys.* 365: 262–267.

- Saxena, H. C.** 1996. Need for reappraisal. Practical aspects of calcium, phosphorus and vitamin D3 nutrition for broilers. *World Poultry*.12, 57.
- Selle, P.H., Ravindran, V.** 2007. Microbial phytase in poultry nutrition. *Anim. Feed. Sci. Technol.* 135, 1–41.
- Selle.P.H., Cowieson.A.J, Ravindran.V.2009.** Consequences of calcium interactions with phytate and phytase for poultry and pigs. *Livestock Science* 124.126–141.
- Selle, P.H., Ravindran, V., Pittolo, P.H., Bryden, W.L.** 1999. An evaluation of microbial phytase in sorghum-based broiler diets. *Proc. Aust. Poult. Sci. Symp.* 11, 97–100.
- Selle, P.H., Ravindran, V., Caldwell, R.A., Bryden, W.L.** 2000. Phytate and phytase: consequences for protein utilization. *Nutr. Res. Rev.* 13, 255–278.
- Selle, P.H., Ravindran, V, Bryden. W. L, Scott. T.** 2006. Influence of Dietary Phytate and Exogenous Phytase on Amino Acid Digestibility in Poultry: A Review. *J. Poult. Sci.* 43.89-103.
- Shirley. R.B, Edwards. Jr.** 2003. Graded Levels of Phytase Past Industry Standards Improves Broiler Performance. *Poultry Science* 82:671–680.
- Short. F. J, Gorton. P, Wiseman. J and Boorman.K. N.** 1996. Determination of titanium dioxide added as an inert marker in chickens digestibility studies. *Animal Feed Science and Technology.* 59:215-221.
- Simons, P.C.M., Versteegh, H.A.J., Jongbloed, A.W., Kemme, P.A., Slump, P., Bos, K.D., Wolters, M.G.E., Beudeker, R.F., Verschoor, G.J.**1990. Improvement of phosphorus availability by microbial phytase in broilers and pigs. *Br. J. Nutr.* 64, 525–540.
- Singh.P.K.,** 2008.Significance of phytic acid and supplemental phytase in chicken nutrition: a review. *World's Poultry Science Journal*, Vol. 64.
- Souchere.V., King. C., Dubreuil. N., Lecomte-morel. V., Lebissonnais. Y., Chalat. M.**2003. Grassland and crop trends: Role of the European Union Common Agricultural Policy and consequences for runoff and soil erosion. *Env.Sci. Pol.* 6: 7-16.

- Steiner. T, Mosenthin. R, Zimmermann. B, Greiner. R, Roth. S.** 2007. Distribution of phytase activity, total phosphorus and phytate phosphorus in legume seeds, cereals and cereal by-products as influenced by harvest year and cultivar. *Animal Feed Science and Technology*. 133: 320-334.
- Suzuki. U., Yoshimura. K., Takaishi. M.,** 1907. Uberein Enzym “Phytase” das Anhydro-oxy-methylendiphosphosaure spaltet. *Coll. Agric. Bull. Tokyo Imp. Univ.* 7, 503–505.
- Teitge, D.A., Campbell, G.L., Classen, H.L., Thacker, P.A.,** 1991. Heat pretreatment as a means of improving the response to dietary pentosanase in chicks fed rye. *Can. J. Anim. Sci.* 71, 507–513.
- Um, J. S, Lim. H. S, Ahn.S.H, and Paik. I. K.** 2000. Effects of microbial phytase supplementation to low phosphorus diets on the performance and utilization of nutrients in broiler chickens. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.* 13:824-829.
- Viveros. A, Brenes. A, Arija. I and Centeno. C.** 2002. Effects of Microbial Phytase Supplementation on Mineral Utilization and Serum Enzyme Activities in Broiler Chicks Fed Different Levels of Phosphorus. *Poultry Science* 81:1172–1183.
- Vries. S, Pustjens.A.M, Schols. H.A, Hendriks.W.H, Gerrits.W.J.J.** 2012. Improving digestive utilization of fiber-rich feedstuffs in pigs and poultry by processing and enzyme technologies: A review. *Animal Feed Science and Technology* 178:123–138.
- Waldroup, P. W.** 1999. Nutritional approaches to reducing phosphorus excretion by poultry. *Poult. Sci.* 78: 683-69.
- Waldroup, P. W., Kersey, J. H., Saleh, E. A., Fritts, C. A., Yan, F., Stilborn, H. L., Crum, R. C. JR. and Raboy, V.** 2000. Nonphytate phosphorus requirement and phosphorus excretion of broiler chicks fed diets composed of normal or high available phosphate corn with and without microbial phytase. *Poult. Sci.* 79:1451-1459.
- Ward, N. E.** 2002. Phytase stability may be improved by new technology. *Feedstuffs*.74: 11-13.

- Woyengo.T.A, Guenter. W, Sands. J. S, Nyachoti. C.M, Mirza.M.A.** 2008. Nutrient utilisation and performance responses of broilers fed a wheat-based diet supplemented with phytase and xylanase alone or in combination. *Animal Feed Science and Technology*. 146: 113–123.
- Woyengo. T. A, Nyachoti. C. M.** 2011. Review: Supplementation of phytase and carbohydrases to diets for poultry. *Can. J. Anim. Sci.*91: 177-192.
- Woyengo. T. A, Nyachoti. C. M.** 2013. Review: Anti-nutritional effects of phytic acid in diets for pigs and poultry-current knowledge and directions for future research. *Can. J. Anim. Sci.*93: 9-21.